UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 814

ÉTUDE D'UN STREPTOMYCES DE LA SÉRIE ALBUS A POUVOIR ANTIFONGIQUE SPÉCIFIQUE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 7 novembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

MARC BERETZ
Pharmacien
Ingénieur-Chimiste

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0050

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 814

ÉTUDE D'UN STREPTOMYCES DE LA SÉRIE ALBUS A POUVOIR ANTIFONGIQUE SPÉCIFIQUE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 7 novembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

MARC BERETZ
Pharmacien
Ingénieur-Chimiste

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY. Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ⚷
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, O. ✻, I. ✪, O. ⚷	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ⚷	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ⚷	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ⚷ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ⚷, ✪	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :
M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM	MATHIS		Chimie
	CARBIENER		Histoire naturelle
	STAHL	(chargés des fonctions)	Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP		Chimie et Physique
	ROMOND		Bactériologie

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur P. CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A toute ma Famille

A quelques Vrais Amis

INTRODUCTION

Nous disposons actuellement d'une grande gamme *d'antibiotiques antibactériens*, cependant notre arsenal thérapeutique ne comportait, jusqu'à ces derniers temps, aucun produit semblable actif contre *les champignons*. Cette lacune est d'autant plus regrettable que *les infections fongiques* prennent de jour en jour une importance croissante en pathologie, d'une part par suite de nos connaissances accrues dans le diagnostic de ces maladies et d'autre part par suite de *l'antibiothérapie bactérienne* qui, souvent, *prépare le terrain aux mycoses*.

Mentionnons *l'histoplasmose* comme exemple du progrès du diagnostic, une maladie considérée jusqu'en 1945 comme rare (74 cas décrits d'après P. LEFORT) et toujours mortelle. Or, à cette époque CHRISTIE et PETERSON ont pu rattacher certaines calcifications pulmonaires à une *histoplasmose ancienne* restée méconnue et décelée grâce au *test à l'histoplasmine*. Ces auteurs ont ainsi démontré l'existence d'une forme bénigne latente de cette maladie mycosique.

Depuis lors la pratique des tests cutanés a montré que *cette mycose* sévit à l'état endémique dans certaines vallées *en Amérique* et principalement dans *le Mississipi et l'Ohio*. Dans certaines régions de ces États, 80% de la population adulte présente un test cutané positif à *l'histoplasmine*, témoignant d'une infection récente ou latente.

L'utilisation des antibiotiques à large spectre d'action paraît avoir provoqué une recrudescence marquée des *moniliases imputables à des formes Levures du type Candida ou Monilia*. A côté des manifestations dermiques et muqueuses communes (*muguet buccal, perlèche, prurit anal, dermatoses*) de nombreux cas de *moniliases viscérales, intestinales, pulmonaires et même généralisées* ont été publiés en *France*, principalement en médecine infantile. *Les moniliases généralisées* provoquent souvent des lésions secondaires diverses, telles que abcès sous-cutanés, méningites, encéphalites, endocardites, etc., *authentifiées par l'isolement de Levures dans le sang et les urines*, ce qui prouve l'existence d'une véritable septicémie.

L'augmentation de *ces mycoses*, leur évolution souvent maligne, l'absence de médicaments spécifiques dans l'arsenal classique, ont fait accueillir avec beaucoup d'espoir la découverte des premiers *antibiotiques antifongiques*. De nombreux *extraits mycéliens* sont actifs « *in vitro* » *sur les champignons inférieurs:* ainsi en 1953 LECHEVALIER en a cité 24, isolés à partir des *Actinomyces*. Beaucoup de ces antibiotiques ont dû

être éliminés par suite de leur toxicité ou de leur activité réduite « *in vivo* ». En 1954, on a étudié la *Candicidine*, extraite de *Streptomyces griseus*, *la Mycoticine* provenant de *Streptomyces ruber*, enfin *la Fongicidine* extraite de *Streptomyces noursei*, actuellement connue sous le nom de *Nystatine ou Mycostatine* et qui est en somme jusqu'à présent le seul antibiotique actif contre les *Candida*.

Entre-temps, plusieurs autres antibiotiques ont été isolés, dont la *Griséofulvine*, sur lesquels nous aurons l'occasion de revenir dans un chapitre de notre historique.

Au début, nous avons orienté nos recherches dans une autre direction, pensant pouvoir isoler *un antifongique à partir de bactéries*. Ces expériences ont été rarement tentées jusqu'à présent et l'accumulation des difficultés ne nous a pas permis d'obtenir de résultats probants.

Finalement c'est par un heureux hasard que nous avons découvert *un antibiotique antifongique* à partir d'un *Streptomyces du groupe Albus* isolé dans des prélèvements pathologiques provenant d'une *orchi-épidydimite granulomateuse pseudo-tumorale*.

C'est donc cet organisme et l'antibiotique isolé qui font l'objet essentiel de notre travail.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, qu'il nous soit permis de remercier ici Monsieur R. Sartory, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* il nous a très aimablement accueilli dans son laboratoire et nous fait le grand honneur de présider notre Jury de thèse.

Nos remerciements vont également à Monsieur P. Cordier, *Professeur de Pharmacie Chimique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour l'amabilité avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre reconnaissance est acquise à Monsieur J. Meyer, *Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* après avoir été l'instigateur de ce travail, il nous a guidé et conseillé au cours de son élaboration, nous facilitant dans la mesure du possible la tâche qui nous était fixée.

Nous ne voudrions pas omettre de remercier Monsieur le Docteur E. Blum, grâce à qui nous avons eu connaissance de ce cas assez rare, et qui nous a transmis tous les renseignements utiles à notre travail.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre gratitude à Monsieur G. Hirtz, Docteur en Pharmacie, qui a bien voulu se charger de la tâche délicate de la microphotographie.

Nous assurons ici Monsieur J. Malgras, *Chargé de Cours*, et toutes les personnes qu'il nous a été donné de connaître dans le si sympathique *Service de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, de notre amical et durable souvenir.

PLAN DE TRAVAIL

Notre travail se divise en *deux parties ;* la première a trait à *l'historique des Actinomyces-Streptomyces.* Nous envisageons dans un chapitre leur classification, puis des *généralités sur les antifongiques et leur mode d'action.*

Dans *la deuxième partie* nous exposons *nos travaux personnels ;* un chapitre est réservé à l'étude et à la caractérisation de *notre Streptomyces;* nous y développons les méthodes d'isolement, les caractères culturaux essentiels pour la détermination. Puis nous envisageons les propriétés biochimiques en ce qui concerne le métabolisme glucidique et protidique, le pouvoir réducteur et les propriétés enzymatiques de notre *Streptomyces.*

Le Chapitre V a trait à l'étude du *pouvoir antibiotique* de notre organisme. Celui-ci est tout d'abord examiné au moyen du substrat de culture et du résidu mycélien. Nous préparons ensuite un extrait brut en partant de ces deux substrats. Une série de recherches doit nous permettre d'élaborer un procédé d'hydrolyse capable de scinder *notre produit antibiotique* en deux fractions, dont l'une contient des glucides et l'autre un noyau azoté, que nous allons essayer de caractériser. Nous entreprenons ensuite des essais de *purification du produit antifongique* pour pouvoir déterminer quantitativement avec plus de précision *les doses antifongiques par rapport à la Nystatine.*

Des essais biologiques vont compléter nos connaissances sur cet antibiotique.

Des conclusion générales terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIFONGIQUES

Le grand nombre des produits utilisés aujourd'hui en *thérapeutique antifongique*, de même que la diversité de la structure chimique de ces médicaments montrent que leur efficacité pharmacologique et chimiothérapique est peu marquée et manque de spécificité. Ce n'est que la découverte d'un médicament à activité vraiment spécifique qui remplacera cette pléiade de produits peu actifs, comme *la Pénicilline* a remplacé un grand nombre de remèdes de *la thérapeutique antibactérienne*.

Nous nous proposons de passer rapidement en revue les principaux composés de *la thérapeutique antifongique* actuelle, et les principales méthodes de contrôle de leur activité « *in vivo* » et « *in vitro* ».

Revue des principaux antifongiques actuellement utilisés :

Underwood et ses collaborateurs (1) ont attiré l'attention dès 1946 sur le grand nombre de produits antifongiques utilisés et sur le danger d'utilisation excessive de certains d'entre eux. Le nombre de publications abordant *le traitement des mycoses* va grandissant d'année en année et il nous est impossible d'en faire une revue avec tout le sens critique qui s'impose. Nous tenons à souligner que dans la plupart des publications, les essais «*in vitro*» et «*in vivo*» n'ont été que des ébauches, ce qui explique que les produits nouveaux disparaissent souvent aussi vite qu'ils sont nés après avoir prouvé qu'ils étaient aussi peu efficaces que ceux utilisés auparavant. Enfin, il ne faut pas oublier que bon nombre *d'infections mycosiques* guérissent spontanément sans aucun traitement et que certaines thérapies n'ont aucun caractère *d'antifongique spécifique*, mais n'influencent le plus souvent que le terrain organique infecté ou l'état général du malade. On peut ainsi mentionner les *rayons X* pour leur action épilatoire dans les cas de *teigne du cuir chevelu*, l'action décapante de *l'acide salicylique* sur la peau, et la perméabilité de l'ongle par *le papier*

de verre dans les onychomycoses, *l'action astringente* de *l'acétate d'alumine* sur le tissu dermique, *l'action desséchante* des poudres évitant la macération de la peau et enfin *l'action anti-inflammatoire de l'hydrocortisone* en compresse ou en crème.

La thérapeutique antifongique actuelle suscite donc une impression de pessimisme et de confusion. Avant d'énumérer le grand nombre de produits utilisés, nous tenons à souligner que l'on cherche à obtenir une *toxicité spécifique sur les champignons* sans effets secondaires sur l'hôte et que cette toxicité peut être « *grosso modo* » classée d'après sa façon d'agir par :

oxydation,

réduction,

précipitation des protéines,

blocage des enzymes,

chélation d'oligo-éléments indispensables,

inhibition du développement du champignon.

On conçoit *qu'une classification* sur ces bases soit presque impossible, de sorte que l'on range *les antifongiques* plutôt par rapport à l'aspect clinique de la maladie, suivant que l'on veuille traiter une *mycose profonde* ou une *mycoses de la peau.*

Antifongiques utilisés dans le traitement des mycoses profondes :

Ces mycoses attaquent les tissus cellulaires des organes internes et comprennent : *les mycétomes (maduromycoses et actinomycoses)* où les éléments du champignon s'agglomèrent de façon à former des *grains* visibles à l'œil nu, et *les paramycétomes* où les éléments mycéliens restent séparés les uns des autres sans formation de grains. Dans ce dernier groupe, nous trouvons la *sporotrichose*, la *chromomycose*, la *rhinosporodiose*, la *coccidioïdomycose* (à *Coccidioïdes immitis*), la *blastomycose sud-américaine* (à *Paracoccidioïdes brasiliensis*), *l'histoplasmose*, *la torulose* (à *Torulopsis deformans*), la *blastomycose nord-américaine* (maladie de Gilchrist à *Blastomyces dermatiditis*). C'est ainsi par exemple que la *torulose* ou *blastomycose européenne* affecte principalement le cerveau, les méninges, le poumon et parfois d'autres organes; que *l'histoplasmose* se manifeste par l'envahissement des phagocytes du système réticulo-endothélial par les éléments levuriformes du parasite.

Si la thérapeutique *des mycoses superficielles* bénéficie, comme nous allons le voir, d'un assez grand nombre de médicaments actifs, il n'en est pas de même dans la thérapeutique *des mycoses profondes*, qui ne dispose jusqu'à ces dernières années, il faut bien l'avouer, que de très faibles moyens de lutte.

L'*iodothérapie* est restée longtemps la méthode de choix pour le traitement des mycoses profondes. C'était la médication classique, recommandée pour la première fois en 1882 par Van Hersan. Introduite dans la thérapeutique bovine par Thomassen en 1885, elle était vulgarisée *en France* par Nocard à partir de 1892. L'efficacité de son action a été démontrée par maints auteurs : A. et R. Sartory et J. Meyer (2) entre autres, signalent les bons résultats obtenus par la médication iodée dans le traitement des *actinomycoses pulmonaires* et *blastomycoses osseuses*.

Si *la médication iodée* a été longtemps considérée comme le traitement spécifique des mycoses profondes, il faut reconnaître, dit Laederich, qu'à côté de cas où il se produit une amélioration immédiate, suivie bientôt de guérison complète et définitive, d'autres cas s'observent où *l'iodure* reste presque inefficace. On a signalé parfois l'existence d'intolérance donnant lieu à des manifestations allergiques. *De toutes façons les iodures sont l'un des plus anciens remèdes utilisés contre les mycoses généralisées et sont toujours employés dans les cas de moniliases, blastomycoses ou sporotrichoses.*

On utilise généralement des solutions saturées d'*iodure de potassium* ou la *teinture d'iode diluée par l'eau ou le lait. L'iodure de sodium* est quelquefois employé par voie intraveineuse. Enfin, les mycoses pulmonaires sont traitées plus directement par inhalations *d'iodure d'éthyle.*

La médication arsenicale a été préconisée en 1953 par Dejan et Nauaranne (3) dans le traitement des *mycétomes* et a donné quelques bons résultats. Poncet et Berard (4) lui reconnaissent une influence sur l'état général et les lésions focales. Foederle estime que le *cacodylate de soude* est plus actif que l'iodure. Le *novarsénobenzol* a également été employé avec succès dans le traitement des lésions actinomycosiques.

Eckert (5) a signalé de bons résultats obtenus par *l'Yathrène* (*acide iodoxyquinoléine-sulfonique*) dans certains cas de *mycoses profondes* où la médication iodurée et la rœntgenthérapie avaient échoué. On a reproché à ce médicament son pouvoir allergisant et toxique, notamment sur la cellule hépatique.

L'apparition des sulfamides a marqué un progrès et semble avoir permis de nombreuses guérisons. C'est surtout la *Sulfadiazine* qui a été utilisée contre *certains champignons inférieurs*, dont les caractéristiques ressemblent le plus à celles *des bactéries*, comme par exemple les *Actinomyces*. Le *Sulfathiazol* et la *Sulfamérazine* semblent avoir un pouvoir semblable à la Sulfadiazine sur *Actinomyces bovis* et *A. israeli* [Keeney (6).] La *Fontamide* ou *Sulfathio-urée* (2 555 RP) est à signaler tout particulièrement ; son administration se fait à la dose de 4 à 5 g par jour avec des liquides alcalins. D'une manière générale toutefois, ces produits ne sont pas très actifs et n'ont pas apporté à la thérapeutique tout ce que l'on attendait d'eux. D'après Curtis et Cowley (7) on trouve dans la littérature quelques cas de guérisons apparentes *d'histoplasmoses et de cryptococcoses* par les sulfamides. Christie (8) a utilisé le *vanillate*

d'éthyle pour *l'histoplasmose de* l'enfant et TISDALE et FLEMER (9) ont employé des *composés antifongiques* à radical di-thio-carbamate, mais avec plus de succès en *agriculture* qu'en thérapeutique humaine.

Un autre groupe de corps chimiques antifongiques est formé par les *diamidines aromatiques ;* ainsi des résultats ont été obtenus avec la *Stilbamidine* contre *les actinomycoses*, *les sporotrichoses* et surtout *les blastomycoses*, mais pas contre *les histoplasmoses*, *les coccidiomycoses et les cryptococcoses*. La *Stilbamidine* ne semble pas avoir de toxicité pour les appareils hépato-rénaux, mais un effet secondaire sur le système nerveux. [ELSON (10), SCHOENBACH (11), CURTIS (12)].

Quant aux antibiotiques, NICHOLS et HENDLE (13) ont été les premiers à attirer l'attention sur l'efficacité de la *Pénicilline*. Des observations ultérieures de THOMPSON et CUTING, de ROBERTS, de TUBBS et BATES, de HENDRICKSON et LEHMAN et d'autres rendent compte de résultats favorables. REISS (14) fait l'éloge de la *Pénicilline* dans le traitement *des mycoses profondes*. L'administration de l'antibiotique doit être massive au début, puis plus faible durant un mois ; les doses dépendent, d'après cet auteur, de la localisation des lésions. Dans les cas *d'actinomycose pulmonaire*, on préconise un à deux millions d'unités par jour. *La Pénicilline* possède en outre l'avantage d'agir aussi sur les infections concomitantes, pour autant qu'elles soient causées par *des bactéries sensibles* à cet antibiotique. Cependant, *la Pénicilline* a connu l'apogée et la désillusion de toutes les nouvelles découvertes thérapeutiques hautement actives, considérées d'habitude au début comme panacées universelles. D'après SANDERS (15), *seules les actinomycoses réagiraient à la Pénicilline.*

La Streptomycine est aussi pratiquement atoxique vis-à-vis des *champignons pathogènes* [REILLY, SCHATZ et WAKSMAN (16)]. D'après STRAUSS, KLIGMAN et PILLSBURG (17) certains cas *d'actinomycose et de nocardiose* ont été traités avec succès par le *Chloramphénicol ou la Tétracycline* et ses dérivés.

De nombreux autres antibiotiques moins connus ont été expérimentés pour leur *activité antifongique*, sans donner de résultats spectaculaires. MA et FONTAINE (18) ainsi que SARTORY, MEYER et UNGAR (19) ont expérimenté la *Tomatine* isolée à l'état cristallisé des tomates sauvages. LACK (20) et WIER (21) ont étudié l'activité antifongique de la *Prodigiosine ;* LANDY (22) a expérimenté la *Bacillomycine*, MOORE et WOOLDRIDGE (23) la *Subtiline*, JOHNSON et BURDON (24) l'*Eumycine*, SWART, ROMANO et WAKSMAN (25), la *Fradicydine*, LOEWENTHAL et TOLMACH (26) la *Clavacine* et finalement CONAN et HYMAN (27) ont étudié la *Protoanémonine.*

Actuellement un grand nombre d'auteurs considère l'effet de *ces antibiotiques* comme absolument inverse de celui que l'on attendait d'eux ; leur usage aurait entraîné *une recrudescence des mycoses* et D.T. SMITH (28) place *les mycoses* au quatrième rang des affections pulmonaires, après

la phtisie, la bronchiectasie et les abcès pulmonaires, d'après des statistiques portant sur 250 000 admissions dans son hôpital.

Parlant plus spécialement des *moniliases*, MENART-POURTANT (29) s'exprime ainsi : « *Jusqu'alors les mycoses étaient des maladies de la déchéance physiologique, le « muguet » se retrouvait chez le nourrisson athrepsique et chez l'adulte cachectique, une mycose muqueuse ou pulmonaire compliquait volontiers une tuberculose à la phase terminale ou un diabète grave, mais actuellement on rencontre des moniliases chez des malades qui, bien que non en parfaite santé, sont loin, cependant, de présenter un tel état de déchéance, mais recevant des antibiotiques* ».

A l'appui de cette affirmation, MENART-POURTANT cite les travaux d'un certain nombre d'auteurs : PAPPENFORT et ESCHNALL ont montré l'action stimulante de *l'Auréomycine* sur le développement de *Candida albicans « in vitro »*, cela à des températures de 3° à 100° et à des pH allant de 4,5 à 11,0.

PESCE (30) a cultivé ce champignon en présence de *Pénicilline et de Streptomycine* et a pu constater qu'il poussait plus rapidement et plus abondamment dans les milieux aux antibiotiques que dans les tubes témoins. Il a même pu affirmer que le nombre et la dimension des cellules augmentent avec la quantité *de Streptomycine* introduite dans le milieu de culture.

FOLEY et WINTER (31) ont également montré l'action stimulante de la *Pénicilline* sur le développement de ces champignons pathogènes.

A ces expériences « *in vitro* » on peut joindre quelques observations faites « *in vivo* ». KUNSTADTER et Mac LEAN (32) rendent responsable l'emploi d'*antibiotiques* de l'apparition d'une *endocardite mycosique* chez un sujet traité par *la Pénicilline* pour une affection pulmonaire.

GEIGER et ses collaborateurs ont publié en 1946 un cas d'endocardite et de méningite à *Monilia* chez un malade traité par *la Pénicilline* pour une infection à *Streptococcus viridans*. OMEROD et FRIEDMAN rapportent un cas de *moniliase pulmonaire* survenu à la suite d'une sinusite maxillaire traitée par *la Pénicilline, l'Auréomycine et la Streptomycine*. WOLFF rapporte en 1952 l'observation d'un malade traité pour une *bronchopneumonie surinfectée par Candida albicans* à la suite d'un traitement de plusieurs jours par *l'Auréomycine et la Streptomycine*. TAYLOR et RUNDLE (33) publient un cas de *moniliase de l'appareil urinaire* à la suite d'un traitement par les antibiotiques, et l'autopsie a permis de constater le blocage des deux uretères par le champignon parasite.

LELONG, ALISON et leurs collaborateurs (34) ont mentionné en 1953 un cas de *septicémie à Monilia* chez un nourrisson atteint de « *muguet* » *et d'une otite*, pour laquelle il a été traité aux antibiotiques à doses massives. DEBRÉ et DROUHET (35) attirent l'attention sur le rôle important qu'auraient les antibiotiques dans l'étiologie *des mycoses profondes à Candida albicans*. Ces observations cliniques ont été renforcées par l'étude expérimentale effectuée par DROUHET, démontrant l'action favo-

risante de la *Chlortétracycline* sur la croissance « *in vivo* » *de Candida albicans* qui peut occasionner de graves affections profondes. Dogeotti (36) a pu mettre en lumière «*in vitro*» l'action stimulante des antibiotiques sur la croissance des Candida.

De nombreux auteurs se sont efforcés d'élucider le mécanisme pathogénique de ces accidents. L'hypothèse généralement admise est celle *du déséquilibre des flores cryptogamiques et bactériennes* dont parlent Rimbaud et Rioux (37) :

« *L'administration d'antibiotiques n'atteint pas seulement le germe que l'on cherche à détruire, mais frappe aveuglément toutes les bactéries sensibles. On assiste ainsi à un déséquilibre bactériologique et fongique.* Barbier (38) *estime que la disparition de la flore du côlon touchée par l'antibiose, flore qui possède normalement une activité synthétique élevée pour la vitamine* B_2, *entraîne une ariboflavinose qui prédispose les muqueuses à l'attaque par les germes bactériens et mycéliens résistants* ».

Le fait à retenir est que *l'emploi des antibiotiques* a considérablement augmenté les « *sorties* » de ces microorganismes.

On peut dire que la médecine était pratiquement désarmée devant cette offensive des *mycoses profondes* jusqu'à ce que Hazen et Brown (39) aient trouvé dans un extrait mycélien de *Streptomyces noursei* un antibiotique, la *Nystatine*, sans activité sur les bactéries, mais très active vis-à-vis des *champignons parasites*. D'après Newcomer (40) elle est active principalement contre *Candida albicans*, contre les *moniliases en général* et les *coccidiomycoses*. Tout en étant pour l'instant l'antibiotique antifongique le plus actif, la *Nystatine* s'est avérée décevante dans le traitement de *nombreuses mycoses généralisées*. Mentionnons pour terminer l'exposé de la thérapie des mycoses les travaux de Sabalitschka et ses collaborateurs (40 a) et ceux de J. Meyer, R. Sartory et Beauvais (40 b) sur le *traitement interne des moniliases par les esters de l'acide para-oxybenzoïque.*

Antifongiques utilisés dans le traitement des mycoses superficielles :

Composés soufrés :

Le soufre sublimé a été utilisé depuis longtemps, mais il semble que son action soit *plus kératolytique que fongistatique*. De nombreux composés soufrés organiques ont une certaine efficacité dans les cas de mycoses superficielles. La *Thio-urée* et ses dérivés ont une bonne activité « *in vitro* », cependant d'après Tager et Danowski (41) ils sont inefficaces « *in vivo* » ou en présence de sérum. Dès 1930, les *Thiocarbamates* ont été utilisés en agriculture. Hopkins (42) a étudié le *disulfure de tétraéthyl-thiurame*, mais son activité comme sa non-toxicité sont discutées. Kligman et Rosenzweig (43), ainsi que Kligman et Anderson (44)

ont obtenu des résultats encourageants *avec les sels de sodium, calcium et fer du diméthylthiocarbamate et le sel de zinc de l'éthylène-bis-dithiocarbamate.* Ces derniers auteurs arrivent cependant à un même pourcentage *de guérisons de teignes* avec l'excipient de pommade seul sans principe actif (*Carbowax*).

L'établissement de *statistiques cliniques* valables semble extrêmement difficile. Hopkins mentionne que la *Phénothiazine* ne lui a pas donné satisfaction, mais d'après Mitchell et ses collaborateurs (45) certains *antihistaminiques* contenant *la Phénothiazine* dans leur noyau moléculaire ont donné des résultats encourageants.

Goetz (46) a pu constater que *l'acide thioglycolique* ne fait que ramollir la kératine sans faciliter par là l'action d'antifongiques associés. De nombreux *autres composés soufrés* (*hyposulfite, sulfamides*, etc.), ont été essayés sans résultat clinique spécial sur des mycoses cutanées.

Composés halogénés :

La teinture d'iode, l'alcool iodé et les pommades iodo-iodurées, tout en étant parmi les plus anciens antifongiques dermiques, restent parmi les plus efficaces. De nombreux *composés organiques iodés* ont été essayés sans qu'on ait pu trouver un produit nettement plus efficace et moins irritant. Bograd (47) recommande le *chlorothymol* et le *chlorure d'éthyle* en pulvérisation ; Hopkins a prouvé que le *trichlorophénol* est souvent mal supporté. Richter (48) a employé le D-25 *(Dihydro-2-2'-dichloro-5-5'-sulfure de diphényl)* soit en applications locales, soit par voie buccale. Sullivan et Bereston (49) ont trouvé le *pentachlorophénate de sodium* comme assez irritant sur la peau et les muqueuses et ont sélectionné le *chloro-5-salicyl-anilide* comme le plus fongistatique parmi treize produits étudiés.

Composés métalliques :

L'usage de *l'acide borique* et du *sulfate de cuivre* a quelquefois donné des améliorations et a suggéré la préparation de composés organométalliques comme *l'oléate, le naphténate ou l'undécylénate de cuivre.* Tous ces produits se sont avérés moins actifs que les dérivés mercuriques. Miller et ses collaborateurs (50) mentionnent que le *chloramidure de mercure* donne souvent de bons résultats avec très peu d'intolérance. Les organo-mercuriels sont plus utilisés comme désinfectants de surface pour la peau que comme chimiothérapiques antimycosiques. D'après Dolce et Nickerson (51) le *chlorure de zinc* conserve une bonne réputation, malgré les résultats négatifs de plusieurs chercheurs. Reiss et Doherty (52) ont obtenu des résultats très intéressants avec le *pyridyl-5-mercaptide.* Les solutions de *nitrate d'argent* sont toujours très utilisées et Franck et Sternberg (53) ont trouvé que le complexe ammoniacal de ce sel n'est pas plus efficace. Sartory et Meyer ont étudié avec leurs élèves Suenderhauf, Schaffhauser et Rickli l'activité antifongique

de différents produits organiques tels que : *Merfène, Désogène et Mercure-phénol-disulfonate de sodium ;* ce dernier leur a semblé le plus efficace comme désinfectant et médicament des *dyshidroses plantaires.*

Composés aliphatiques :

La *formaldéhyde*, quoique très active, ne se prête pas bien à l'utilisation thérapeutique.

Les acides gras à 11 et 12 carbones, comme *l'acide undécylénique*, de même que *l'acide propionique*, sont des constituants normaux de la sueur et donnent quelquefois de bons résultats. De nombreux auteurs, tels que Oster et Golden (54), puis Mitchel (55), etc..., ont cependant souligné l'inefficacité antifongique expérimentale de ces acides gras. Nous renvoyons également au travail de Simone Malhuret (55 a) sur l'action fongicide de quelques acides gras, comparée à celle des antimycosiques habituels.

Composés aromatiques :

L'*acide salicylique* continue à être employée dans les dermatomycoses, alors que son action est purement kératolytique et non fongistatique. Le phénol est aussi peu actif qu'il est irritant [Golden et Oster (56)], mais *l'acide benzoïque* a d'assez bonnes qualités antifongiques. De nombreux autres composés phénoliques ont été utilisés, puis abandonnés, en particulier les *dérivés halogénés* [Walker, Porter et Dekay (57)]. D'après Mac Gavack et ses collaborateurs (58) *certaines quinones* peuvent se montrer actives « *in vitro* » mais peu pratiques en thérapeutique. Woodward et ses élèves (59) ont montré que les variations du pouvoir fongicide de nombreux dérivés phénoliques sont dues au radical halogéné: *ainsi les dérivés iodés sont plus actifs que les dérivés bromés, qui sont plus actifs que les chlorosubstitués.* Par contre, le groupe NO^2 ne semble pas influencer l'activité antifongique.

Produits divers :

Lewis, Hopper et Reiss (60) ont cherché sans succès une activité antifongique chez les hormones. Seul le *diéthyl-stilboestrol* a une légère action. Les espoirs fondés sur les *ammoniums quaternaires* furent vite déçus, lorsque l'expérimentation « *in vivo* » montra non seulement l'absence d'efficacité, mais encore l'absence de synergie avec d'autres produits antifongiques [Reiss et Lustig (61)].

Les colorants comme le *violet de gentiane* restent parmi les produits les plus actifs « *in vitro* ». Ainsi, Riley et Flower (62) ont constaté que *Candida albicans* ne se développe plus dans une dilution à 1/1 000 000 de ce colorant. Cependant, l'utilisation thérapeutique de ces colorants est freinée par leur manque d'esthétique et par les dégâts occasionnés au linge.

Certains dérivés de la 8-*hydroxyquinoléine* ont donné des résultats intéressants. Oster et Golden (63) mentionnent en particulier le *benzoate* et la *dichloroquinoléine*. Sartory, Meyer et leurs élèves Widder (63 a) et Wahba (63 b) ont pu démontrer le pouvoir antifongique de quelques dérivés hydroxyquinoléiques et en particulier de la *Vuzine*, dérivé hydrocupréinique.

Enfin certains antibiotiques semblaient apporter l'espoir d'une médication nouvelle. La *Nystatine* a encore la faveur de certains, surtout que l'administration « *per os* » d'un antibiotique plus récent, la *Griséofulvine*, ne semble avoir qu'une action complémentaire au produit plus classique utilisé dans le traitement des mycoses superficielles.

Dans quelle direction faut-il rechercher le produit vraiment *polyvalent dans son spectre antifongique*, tout en étant peu toxique et facile à administrer ? Plusieurs antibiotiques antifongiques sont actuellement à l'étude, tels que la *Candicidine*, *Duramycine*, *Amphotéricine*, *Cyclohéximide*, *Filipine et Rimocidine* (*Documentation des Journées Pharmaceutiques Françaises, septembre 1960*). Quelques-uns de ces antibiotiques ont été envisagés plus en détail dans le travail de Greze (64), auquel nous renvoyons à ce sujet.

CHAPITRE II

MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES

Presque tous les microorganismes habitant un milieu naturel, tel le sol ou l'eau, sont l'objet de nombreuses actions antagonistes associatives ou symbiotiques, comme l'estime Waksman (65). Chaque organisme est influencé directement ou indirectement par un ou plusieurs des membres constituant la population complexe des substrats naturels. Ces influences peuvent être considérées comme provenant de la concurrence pour la nourriture. Ceci a été parfaitement exprimé par Pfeffer qui dit que « *le monde entier et toutes les relations synergiques ou antagonistes des différents organismes sont surtout réglés par la nécessité d'obtenir la nourriture* ». Toutefois, on a bientôt reconnu que cette explication ne s'appliquait pas complètement à toutes les interrelations complexes des microorganismes dans la nature.

Les relations symbiotiques et les relations antagonistes parmi les microorganismes résultent en des avantages ou des inconvénients pour l'organisme dans l'association particulière envisagée. Les premières sont avantageuses, les secondes sont néfastes et peuvent coïncider avec le parasitisme. Quand deux organismes sont capables d'utiliser les mêmes aliments, mais sont influencés différemment par les conditions environnantes, comme le pH, l'aération et la température, celui qui trouve ces conditions plus avantageuses pour sa croissance se développe plus rapidement et plus longtemps et est capable de supprimer l'autre. Suivant Porter, des champignons en culture mixte occasionnent la disparition des aliments ou la formation de substances nuisibles ou utiles. Quand deux ou plusieurs organismes vivent ensemble, ils peuvent exercer des effets antagonistes, indifférents ou favorables. Ces possibilités ont été ensuite élargies de façon à pouvoir inclure des effets stimulants, inhibiteurs, envahissants ou frénateurs. Après de nombreuses expériences et hypothèses, Lasseur (66) en vint à la conclusion que *l'antagonisme est un phénomène très complexe et le résultat d'activités nombreuses encore mal connues.* L'antagonisme influence la morphologie des organismes, les possibilités de formation de pigment et d'autres processus physiologiques.

Le terme « *synergisme* » a été utilisé pour désigner l'action de deux organismes vivants qui déterminent des modifications que chacun d'eux, pris isolément, ne pourrait accomplir. *Des microbes vivant en association ont des propriétés caractéristiques qu'ils ne possèdent pas quand ils vivent*

en culture pure. Par exemple SCHILLER trouve que lorsque *les levures de bière* sont placées avec *des bactéries tuberculeuses* dans un milieu contenant un sucre, mais dépourvu d'azote, les levures développent des propriétés antagonistes vis-à-vis des bactéries et utilisent ces dernières comme source d'azote en sécrétant une substance bactériolytique qui est active même en dehors des cellules. Différentes bactéries sont capables de tuer des levures quand elles sont inoculées dans des suspensions aqueuses de ces dernières. La destruction du champignon *Ophiobolus*, l'agent causal du *piétin des céréales*, par les microorganismes du sol, semble résulter du besoin en azote de ces derniers.

PAPACOSTAS et GATÉ suggèrent d'appliquer le terme « *antibiose* » aux interactions dans les cultures mixtes « *in vitro* » et « *antagonisme* » aux cultures mixtes « *in vivo* ». Afin d'éviter de faire croire que les deux interactions dans les tubes de culture et dans les organismes vivants sont de nature différente, il est préférable d'appliquer le terme « *antagonisme* » aux effets défavorables d'un être vivant sur un autre et « *antibiose* » à la production par un germe d'une substance *chimique spécifique* qui a un effet défavorable sur un autre organisme.

Quand deux ou plusieurs organismes vivent ensembles, l'un peut devenir antagoniste de l'autre. La composition du milieu et les conditions de culture influencent la nature et l'action de l'antagonisme ; le métabolisme et la structure cellulaire de l'organisme sur lequel s'exerce l'antagonisme peuvent être modifiés, la cellule elle-même peut être détruite. Dans l'urine, par exemple, les *Staphylocoques* peuvent devenir antagonistes de *Escherichia coli ou vice versa*, ceci dépend du nombre initial des deux groupes, de la formation des produits métaboliques, ou de l'épuisement des éléments nutritifs. Les substances toxiques produites par les antagonistes peuvent être de constitution très différente allant des acides organiques et des alcools simples aux produits complexes de nature protéinique ou polypeptidique.

Différents types d'antagonismes ont été mis en évidence. NAKHIMOVSKAIA conclut que *tous les phénomènes d'antagonisme* parmi les microorganismes se classent en deux groupes :

1° *Antagonisme « in vivo » et antagonisme « in vitro »* : Suivant certains chercheurs, seuls les effets inhibiteurs « *in vitro* » peuvent être considérés comme de *vrais antagonismes ;* les actions nuisibles « *in vivo* » furent considérées comme des phénomènes *d'antibiose.* Comme nous l'avons fait remarquer plus haut, cette différenciation n'est plus admise.

2° *Les formes inhibitrices, bactéricides ou lytiques d'antagonisme :* On devrait plutôt distinguer entre les formes d'antagonismes bactériostaques, bactéricides, fongistatiques, fongicides, puis entre les antagonismes de fonction et les antagonismes de développement.

Parmi les différents types d'antagonisme, celui résultant de *la production de substances antimicrobiennes actives* qui peuvent être isolées et purifiées, a retenu fortement l'attention ces dernières années. Ces

produits peuvent être considérés comme toxines, poisons, agents antagonistes, bactériostatiques et antibiotiques. La nature chimique de certains a été élucidée, mais celle de beaucoup d'autres est encore inconnue. Quelques-unes de ces substances sont détruites par ébullition, par exposition à la lumière ou par filtration, alors que d'autres sont résistantes à la chaleur, aux rayons ultra-violets ; quelques-unes sont rapidement adsorbées par certains filtres d'où elles peuvent être récupérées par des solvants organiques comme l'éther, l'alcool, le chloroforme et l'acétone. La concentration des substances antagonistes produites par *de nombreux champignons et bactéries* est très influencée par des sources énergétiques et d'azote du milieu puis par les conditions ambiantes, telles la température et l'aération.

Dans ces derniers 40 ans des essais systématiques ont été effectués pour déterminer la distribution des antagonistes dans la nature, et pour isoler les organismes spécifiques capables de déterminer les réactions désirées et d'établir le mécanisme en cause dans ces réactions. Ces études furent entreprises à la fois par un groupe *de chercheurs russes*, intéressés surtout par *les champignons et les actinomycètes*, agents antagonistes d'autres microorganismes parasites des plantes, et par *les savants américains et anglais* s'intéressant plutôt aux agents actifs contre des bactéries pathogènes de l'homme.

Effets antagonistes des bactéries et des actinomycètes sur les champignons :

Différentes bactéries et actinomycètes ont des effets fongistatiques et fongicides sélectifs nets. Des bactéries actives contre *Ustilago zeae* furent isolées du maïs; elles sont capables de détruire les colonies de champignon du *Charbon des céréales*. La vaste distribution de telles bactéries dans le sol fait penser qu'elles ralentissent la multiplication des champignons pathogènes. Quatre types de bactéries antagonistes des champignons du Charbon, ont été décrits. Quelques-unes de ces bactéries *produisent des enzymes* qui sont capables de dissoudre « *in vitro* » les constituants chimiques des parois cellulaires des sporidies de ces champignons : elles sont actives, aussi dans le sol, contre ces champignons. Brown a observé que *Helminthosporium sativum* et une certaine bactérie produisaient des substances mutuellement inhibitrices et thermostables. La bactérie, ainsi que ses produits métaboliques, inhibent non seulement le développement de ce champignon particulier ainsi que celui d'autres membres de ce même genre, mais aussi celui de *Fusarium conglutinans*. Ces bactéries produisent une substance diffusible qui inhibe le développement d'*Helminthosporium sativum*. La substance active n'est pas détruite à l'autoclave, elle diffuse dans la gélose et l'eau, produisant le « *stale water* » qui est inhibiteur du champignon.

Dans le tableau suivant nous énumérons un certain nombre de bactéries possédant d'après WAKSMAN un pouvoir antifongique spécifique contre des organismes cryptogamiques donnés :

TABLEAU N° 1

Effets antagonistes de bactéries sur les champignons (d'après NOVOGRUDSKY).

Antagoniste	Organisme affecté	Référence
Achromobacter sp.	Fusarium, Sclerotinia	CHUDIAKOV J.-P.
Alcaligenes faecalis	Helminthosporium	PORTER C.-L.
Bacillus « D »	Ustilago, Penicillium	BAMBERG R.-H.
Bacillus anthracis	Saccharomyces cerevisiae	KOPACZEWSKY W.
Bacillus mesentericus	Helminthosporium	CHRISTENSEN J.-J.
Bacillus mycoïdes	Helminthosporium	PORTER
Bacillus simplex	Rhizoctonia	CORDON et HAENSELER
Bacillus subtilis	Cephalothecium roseum	ALEXOPOULOS C.-J.
Bacterium sp.	Fusarium, Sclerotinia, etc.	PORTER C.-L.
Bacterium sp.	Ustilago	JOHNSON D.-E.
Myxobacterium	Ustilago	FAWSETT H.-S.
Proteus vulgaris	Basisporium, Phytophtora	KING, HOPE, EATON
Pseudomonas aeruginosa	Saccharomyces	KOPACZEWSKY W.
P. juglandis	Dothiorella	FAWSETT H.-S.
P. phaseoli	Fusarium	BISBY, JAMES, TIMONIN
P. translucens	Ophiobolus	BROATFOOT W.-C.
P. vulgaris	Ophiobolus	BROATFOOT W.-C.
Serratia marcescens	Beauveria, etc.	MASERA E.
Bactéries formant des spores	Champignons	PORTER.

CHUDIAKOV a isolé du sol deux bactéries capables de provoquer la lyse de différentes espèces de *Fusarium* ainsi que celle d'autres champignons. Ces bactéries sont largement répandues ; *elles sont absentes cependant dans les sols où la maladie du lin existe en dépit de l'abondance des Fusarium*. Quand ce champignon est ensemencé dans le sol contenant ces bactéries antagonistes, *il ne se développe pas et les plantes ne deviennent pas malades*. L'action antagoniste de nombreuses autres bactéries contre les champignons pathogènes des plantes a été prouvée d'une façon certaine, comme dans le cas de l'action de *Bacillus simplex* contre *Rhizoctonia*, de *Proteus vulgaris* contre *Phytophtora*, et de *Bacillus mesentericus* contre *Helminthosporium*. Bacillus simplex est cultivé pendant 7 jours à 28° dans un milieu de pommes de terre glucosé contenant 1% de peptone ; la substance active est isolée par du charbon activé et dissoute dans l'alcool. Les champignons ont un degré de tolé-

rance différent pour cette substance. La plupart sont arrêtés quand 10 % du substrat cultivé et filtré sont ajoutés au milieu frais.

La possibilité de produire une substance thermostable toxique pour les *Rhizoctonia*, champignons parasites des plantes, est très répandue parmi les bactéries sporulées. La substance toxique est insoluble dans l'éther, le chloroforme et le benzol. Elle est ultrafiltrable à travers le collodion, la cellophane, les membranes de parchemin. Elle est rapidement détruite par ébullition dans un milieu alcalin, mais résiste mieux dans les milieux acides.

Nakhimovskaia a trouvé que différentes bactéries sont capables d'inhiber la germination des *spores de rouilles*. Les bactéries non sporulées, telles *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*, empêchent la germination des spores d'*Ustilago hordei*, *Ustilago nada et Ustilago zeae*. Par contre, des bactéries sporulées, telles que *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus mesentericus* ainsi que des Sarcines (*Sarcina ureae*, *Sarcina lutea*) n'exercent pas d'action antagoniste sur les spores de rouilles. La présence de ces bactéries influence le mode de germination des spores, qui donnent naissance à des filaments mycéliens et des éléments sexués, alors que dans la culture témoin, les formes levures prédominent et les cellules copulantes sont rares. La présence d'une certaine concentration de substance cellulaire est essentielle pour l'obtention de cet effet antagoniste. Avec une quantité plus limitée de matériel cellulaire, les bactéries cessent d'inhiber la germination des spores, mais influencent les processus de germination de la même façon que le font les bactéries non antagonistes, c'est-à-dire qu'elles stimulent les processus sexués. Une augmentation dans la concentration de la substance cellulaire, même celle d'organismes non antagonistes, inhibe la germination des spores.

La présence du champignon *Pyronema confluens* dans les sols fraîchement brûlés, mais non dans les sols naturels, s'explique par la destruction des bactéries antagonistes par la chaleur. *Pseudomonas fluorescens* est particulièrement actif comme agent antagoniste. *Une étude comparative des actions fongistatiques de substances d'origine bactérienne a montré que celles-ci étaient plus actives que les désinfectants ordinaires.* La Tyrothricine par ex. inhibe le développement de certains parasites des animaux à la dilution de 1/20 000 à 1/50 000 et l'Hémipyocyanine à la dilution de 1/20 000 à 1/60 000.

Les *Actinomycètes* peuvent aussi exercer une action frénatrice marquée sur le développement des champignons. Les substances actives produites par ces organismes montrent une action sélective considérable, comme dans le cas des bactéries. *L'Actinomycine* inhibe le développement des *Penicillium*, *Aspergillus*, *Ceratostomella* et des *levures* à la concentration de 1/50 000 ; des concentrations plus fortes — 1/10 000 — sont nécessaires pour inhiber d'autres champignons, tels les *Rhizopus* et les *Trichoderma*. La *Streptothricine* est moins efficace contre les champignons, elle inhibe cependant le développement de certaines levures.

En général, les antibiotiques varient aussi bien dans leurs effets antifongiques que dans leurs effets antibactériens. Quelques-uns, comme la *Gliotoxine* et l'*Actinomycine*, sont très actifs à la fois contre les champignons parasites et contre les champignons saprophytes, alors que d'autres, comme la *Chaetomine* et *la Streptomycine*, n'ont que peu d'action si toutefois elles en ont une. Étant donné que quelques substances comme l'Actinomycine ont un effet toxique puissant sur les tissus animaux, *la sélection d'une substance antimycosique convenable en vue d'applications thérapeutiques* se réduit à peu de produits laissant quelques espoirs.

CHAPITRE III

CLASSIFICATION DES ACTINOMYCES

D'après LANGERON, *les Actinomyces pathogènes* se divisent en deux sous-genres :

1° *Euactinomyces* avec la section des *Parasitici ;*

2° *Cohnistreptothrix.*

Ces derniers sont des *Microsiphonées* difficiles à cultiver, anaérobies, mais pouvant aussi vivre en aérobiose. Ils ne produisent pas d'arthrospore.

Quant à la section des Parasitici, elle se divise en trois sous-sections : *Majores, Minores et Breviores.*

Sous-section Majores :

Elle comprend *les Actinomyces* faciles à cultiver, produisant sur les milieux solides une efflorescence blanche, crétacée. Les filaments sont nettement ramifiés, plus volumineux que dans les deux autres groupes, en général non acidorésistants. Les cultures répandent souvent une odeur de moisi. Cultures faciles sur pomme de terre, ainsi que sur gélatine et sur sérum coagulé qui sont tous deux liquéfiés. Il y a sécrétion de diastases qui digèrent l'amidon.

Sous-section Minores :

Ce sont *des Actinomyces* assez faciles à cultiver ; sur milieux solides ils présentent l'aspect des cultures *du Bacille tuberculeux ;* elles sont ternes, poudreuses à la fin, généralement sans odeur. Les filaments, *presque toujours acidorésistants*, sont rarement ramifiés. Ils ne liquéfient pas la gélatine et le sérum coagulé ou seulement un des deux ; ils végètent pauvrement sur pomme de terre et ne produisent pas de diastases. De *tous les Actinomyces*, ces espèces sont les plus pathogènes et produisent habituellement des lésions généralisées.

Sous-section Breviores :

Actinomyces difficiles à cultiver. Le milieu le plus favorable est le bouillon peptoné, dans lequel ils forment de petites colonies isolées,

collées au fond et aux parois du tube. Sur milieux solides, les cultures ne sont pas efflorescentes ; elles sont généralement sans odeur. Les filaments non ramifiés sont réduits à de courts articles bacilliformes. Ils ne liquéfient ni la gélatine, ni le sérum coagulé, ne produisent pas de diastases, ne végètent pas sur pomme de terre.

D'une manière plus générale les *Actinomyces* font notoirement partie de l'ordre des *Microsiphonées* qui, initialement, comportait deux familles : les *Actinomycétacées* et les *Actinobactériacées*. Cette classification est adaptée à la pathogénéité de ces organismes. Leurs difficultés de culture, lorsqu'ils proviennent de maladies, ont fait que la parenté entre les *Actinomyces du type de* Harz et les *Streptothrix du type de* Cohn fut longue à établir, d'autant plus que l'on a découvert dans l'air et dans l'eau des végétaux ayant la même morphologie que les *Streptothrix* du type de Cohn et qui s'éloignaient par leur nature saprophytique des *Actinomyces parasites*. On sait que ces derniers sont caractérisés surtout par des formes en massue, étudiées pour la première fois par Harz. D'autre part, comme nous venons de le voir parmi *les Actinomyces parasites*, les uns se cultivent bien en présence de l'air, alors que d'autres ne vivent qu'en anaérobiose. Tous ces organismes ont été tantôt réunis, tantôt séparés et dans ce dernier cas, des noms de genres ont été créés. Ceci, joint à d'interminables discussions de priorité, comme dit Duché (67), a rendu extrêmement confuse la systématique de ce groupe d'organismes, dont les représentants augmentaient dans des proportions considérables.

En effet, de 1880 à 1910, un nombre incalculable *d'actinomycoses* a été décrit ; en plus des concrétions lacrymales, des tumeurs du pied ou « *pied de Madura* », des actinomycoses de la mâchoire, on signalait des actinomycoses pulmonaires simulant des tuberculoses, des méningites actinomycosiques, des affections intestinales, hépatiques et cutanées, enfin des actinomycoses généralisées à forme septicémique, tant chez l'homme que chez l'animal. Ces maladies se caractérisaient par la présence de grains actinomycétiques dans le pus ; *cet argument s'est ensuite avéré comme non valable, étant donné qu'on peut trouver des formations de grains dans un grand nombre d'autres infections* ; par la suite, l'étude des Actinomyces exigeant une spécialisation assez poussée des biologistes-mycologues, s'est avérée très difficile et a ainsi contribué à la diminution des cas publiés.

Il est compréhensible que pendant la même période, les *Actinomyces saprophytes* n'ont pas été étudiées aussi activement que leurs homologues *parasites*, leur importance paraissant moindre et leur isolement à partir de l'air, de l'eau et du sol, étant très difficile. Cependant, après les travaux de quelques mycologues (Lieske, Lachner, Neukirch, Bainier, Sartory, etc.), montrant les propriétés intéressantes de ce *groupe saprophyte*, et le travail remarquable de Krainsky en 1914, les Américains ont repris ces études anciennes. Ils ont multiplié dans des proportions considérables nos connaissances sur ces *Streptothrix* et leur

ont attribué un rôle de premier plan dans le métabolisme des matières organiques du sol, en particulier dans la décomposition des matières cellulosiques. A ces travaux il faut joindre ceux de *l'École russe, de sorte qu'actuellement le genre Streptomyces a pris une importance beaucoup plus considérable que les Actinomyces pathogènes*, à tel point que la classification actuelle de Waksman (68) ne mentionne plus que deux espèces dans le *genre Actinomyces : A. bovis et A. israëli.*

D'après la classification de Bergey, adoptée par Hauduroy (69), il faut distinguer les trois familles suivantes :

Actinomycétacées Buchanan:

Le mycélium n'est pas cloisonné pendant le début de la croissance, mais par la suite, il se cloisonne et peut se diviser en courts fragments sous forme de bâtonnets ou de sphères. Il peut aussi rester non cloisonné et produire des spores ou des hyphes aériens. Dans les milieux de culture les organismes sont incolores ou produisent des pigments différents. Certaines espèces sont partiellement acidorésistantes. Cette famille se différencie de celle des *Mycobactériacées* par la formation d'un mycélium vrai. Comparée avec la famille des *Streptomycétacées*, elle se différencie par sa manière de former des spores. Nous pensons que la sous-section Majores des Euactinomyces de Langeron devrait être classée dans cette famille.

Streptomycétacées Waksman et Henrici:

Mycélium végétatif qui ne se fragmente pas, ni en forme de bacilles, ni en forme de coques. Les conidies poussent sur des sporophores. Ces germes se trouvent dans le sol, quelquefois on trouve des formes thermophiles dans le fumier. De rares espèces sont parasites.

Actinobactériacées Prévôt:

Il s'agit des *Actinomycétales non acidorésistantes*, Gram-positives et Gram-négatives, en général immobiles, rarement mobiles. Prevot les range dans l'ordre des *Actionobactériales* et y distingue deux familles : les *Actinobactériacées*, synonymes des *Cohnistreptothrix* de Langeron, qui sont des champignons microscopiques ne poussant qu'en anaérobiose, et les *Actinomycétacées*, se développant en aérobiose ou micro-aérobiose, dont devraient faire partie, à notre avis, les sous-sections Minores et Breviores de Langeron.

Les *Actinomyces parasites*, tels qu'ils sont envisagés par Bergey, Hauduroy et Prevot, ne nous intéressent qu'au titre de l'étude phylogénétique dans le cadre de notre travail. Nous allons surtout envisager *la taxonomie des Streptomyces.*

Classification des Streptomyces:

En 1953, Waksman et Lechevalier ont établi leur nouvelle classification en modifiant celle publiée en 1943 par Waksman et Henrici.

Ils envisagent les genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermoactinomyces et Actinomyces*.

A cette classification on peut objecter différents arguments, tels qu'ils ont été formulés par KRASSILNIKOV (70) et par GAUSE (71) et ses collaborateurs. Alors que WAKSMAN ne reconnaît que les caractères culturaux pour le diagnostic, KRASSILNIKOV établit sa classification en se basant essentiellement sur la structure de l'appareil sporifère. Le principe de la classification de WAKSMAN a été largement discuté en 1953, au *Congrès International de Microbiologie*, principalement par BALDACCI qui prend comme base des classifications la morphologie des cultures, en considérant le mycélium végétatif et aérien. Selon cette conception *des espèces d'Actinomyces telles de A. griseus, A. albus, A. flavus, etc., ne constitueraient pas des genres nettement définis*, mais feraient partie de catégories systématiques plus vastes, qu'il faudrait subdiviser en divers genres. Cet auteur propose donc de diviser les *Actinomycétacées* en différentes sections, selon la couleur du mycélium. Ces sections sont de leur côté divisées en séries, suivant la couleur des hyphes aériens. Ces séries sont alors classées en genres et en espèces, en considérant les caractères morphologiques, culturaux et biologiques plus précisément.

En se basant sur ces considérations, GAUSE et ses collaborateurs ont établi à leur tour une nouvelle classification basée sur la pigmentation du mycélium aérien et végétatif, et sur des caractères morphologiques et culturaux se manifestant sur deux milieux de culture nettement définis, dont le premier ne renferme que de l'azote minéral, alors que le second contient de l'azote organique. Ces substrats ont la composition suivante :

1) Milieu minéral:

Nitrate de potasse	1,0 g
Phosphate bipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Chlorure de sodium	0,5 g
Sulfate ferreux	0,01 g
Amidon	20,0 g
Gélose	30,0 g
Eau ordinaire q.s.p.	1 000,0 cc

2) Milieu organique:

Solution Hottinger	30,0 cc
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Glucose	10,0 g
Gélose	30,0 g
Eau ordinaire q.s.p.	1 000,0 cc

La *solution Hottinger* contient 700 mg % d'azote aminé.

En se basant sur ces faits, les auteurs ont établi les séries suivantes :

Série Lavendulae roseum :

Sur milieu 1 : Mycélium aérien rose lilas, mycélium végétatif incolore. Cette série se divise en trois groupes, suivant l'aspect *sur milieu* 2 :

Pas de pigmentation : groupe A,
Pigmentation brune ou noirâtre : groupe B,
Pigmentation jaune : groupe C.

Série Fradiae :

Sur les deux milieux : mycélium aérien rose, mycélium végétatif jaune.

Série Fuscus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien rose, mycélium végétatif brunâtre.

Série Roseoviolaceus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien rose, mycélium végétatif violet.

Série Ruber :

Sur les deux milieux : mycélium aérien rose, mycélium végétatif rouge. Les espèces de cette série peuvent être rangées en trois groupes, suivant leurs sporophores droits, spiralés ou verticillés.

Série Helvolus :

Sur milieu 1 : mycélium aérien jaune verdâtre, mycélium végétatif pigmenté ou non.

On distingue deux groupes, suivant les sporophores droits ou spiralés ; ces groupes sont divisés en deux sous-groupes dont l'un a un mycélium végétatif pigmenté, alors que pour l'autre il est incolore.

Série Albus :

Sur milieu 1 : mycélium aérien blanc, mycélium végétatif incolore.

Sur milieu 2 : suivant la pigmentation, on distingue trois groupes : A — milieu incolore ; B — milieu gris brunâtre ; C — milieu gris rougeâtre.

Série Albus sporeus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien blanc, mycélium végétatif rouge ou brunâtre.

Série Coerulescens :

Sur les deux milieux : mycélium aérien bleu clair à vert bleuâtre.

On peut diviser cette série en trois groupes, en considérant l'aspect *du milieu* où le mycélium végétatif est incolore ou plus ou moins coloré.

Série Griseus :

Sur milieu 1 : mycélium aérien gris, mycélium végétatif incolore.

Sur milieu 2 : mycélium aérien gris, mycélium végétatif pigmenté permettant de différencier trois groupes :

A — milieu incolore ; B — milieu gris brunâtre ; C — milieu jaune, vert olive ou rougeâtre.

Série Nicrescens :

Sur les deux milieux : mycélium aérien gris, mycélium végétatif incolore.

Entre le 10e et le 15e jour de culture, le mycélium aérien s'autolyse et prend une teinte noire.

Série Aureus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien gris, mycélium végétatif jaune, orange ou brunâtre.

Série Chrysomallus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien gris, mycélium végétatif vert à brunâtre.

Série Chromogenes :

Sur les deux milieux : mycélium aérien gris, mycélium végétatif brun noirâtre.

Série Violaceus :

Sur les deux milieux : mycélium aérien gris, mycélium végétatif bleu violet à rouge brunâtre.

Lors de l'isolement d'une nouvelle souche de *Streptomyces*, il faut observer les propriétés morphologiques des cultures pendant environ 6 mois, puisque les caractères peuvent changer sur milieu artificiel. En suivant ces indications, établies par Gause et son école, le biologiste a à sa disposition une méthode pratique, permettant de déterminer une nouvelle souche avec assez de facilité. Ceci est particulièrement inté-

ressant actuellement pour classer de nouvelles espèces à pouvoir antibiotique. Nous tenons à rapporter ici un tableau établi par ces auteurs et illustrant la facilité d'identification de ces germes.

TABLEAU N° 2

Série	Mycélium aérien	Mycélium végétatif	Nombre d'espèces examinées	
			Souches connues	Souches inconnues
Lavendulae roseum	rose lilas	incolore	2	9
Fradiae	rose	jaune	2	4
Fuscus	rose	gris brunâtre	1	4
Roseoviolasceus	rose clair	violet	0	2
Ruber	rose	rouge	2	2
Helvolus	jaune verdâtre	incolore ou coloré	5	9
Albus	blanc	incolore	4	2
Albus sporeus	blanc	rouge brunâtre	1	3
Coerulescens	bleu verdâtre	incolore ou coloré	1	7
Griseus	gris	incolore	3	7
Nicrescens	gris, puis noir	incolore	0	1
Aureus	gris	jaune ou orange	7	3
Chrysomallus	gris	vert brunâtre	2	3
Chromogenes	gris	brun noirâtre	3	4
Violaceus	gris	bleu violet à rouge brunâtre	4	11
		Total :	37	71

Comme on le constate, les auteurs ont examiné 108 espèces ou variantes de *Streptomyces à action antibiotique*, dont trente-sept avaient déjà été décrites antérieurement, alors que 71 souches ont été fraîchement isolées et classées par eux. Ce fait démontre l'utilité de cette technique pour l'établissement d'un diagnostic taxonomique.

En considérant les résultats du tableau ci-dessus, nous pouvons constater le bien-fondé du raisonnement de Gause et collaborateurs ; en effet, dans les cinq premières séries on note que le mycélium aérien présente toujours une pigmentation rose plus ou moins nuancée, tandis que le mycélium végétatif reste incolore ou prend des teintes jaunes, brunes, violettes ou rouges. Il en est de même pour les six dernières séries à mycélium aérien gris tandis que le mycélium végétatif peut être incolore, jaune, brunâtre ou rose-violet.

On peut en conclure que la pigmentation du mycélium végétatif et du mycélium aérien peut se modifier individuellement. On doit donc prendre

comme premier caractère différentiel la pigmentation du mycélium aérien, mais elle ne peut pas suffire seule, et il y a lieu de considérer celle du mycélium végétatif pour l'établissement des séries taxonomiques. Au cours de nos travaux, nous avons pu constater le bien-fondé de cette argumentation, beaucoup plus rationnelle que celle de BALDACCI qui opérait de la manière inverse, surtout puisque la pigmentation du mycélium aérien, c'est-à-dire de l'appareil sporifère, est beaucoup plus constante que celle du mycélium végétatif.

Comme autres caractères morphologiques pouvant servir à une classification plus poussée, on peut faire appel à la constitution de l'appareil sporifère même, où l'on peut distinguer, comme nous l'avons vu, *des sporophores droits, spiralés ou verticillés*. GAUSE et ses collaborateurs ont démontré l'importance de ces éléments dans un tableau que nous reproduisons :

TABLEAU N° 3

Série	Sporophores		
	droits	spiralés	verticillés
Lavendulae roseum	4	6	1
Fradiae	2	4	0
Fuscus	2	2	1
Roseoviolaceus	0	2	0
Ruber	1	2	1
Helvolus	9	5	0
Albus	3	3	0
Albus sporeus	2	2	0
Coerulescens	0	8	0
Griseus	0	10	0
Nicrescens	0	1	0
Aureus	3	7	0
Chrysomallus	1	4	0
Chromogenes	2	5	0
Violaceus	4	11	0
Total	33	72	3

En considérant ce tableau, on constate que la forme typique de l'appareil sporifère est spiralée chez les *Streptomyces*, rencontrée dans toutes les séries. Parmi les 108 espèces étudiées par ces auteurs, 72 possédaient un appareil sporifère spiralé. Un sporophore droit se rencontre plus rarement (dans 11 séries), ainsi les auteurs l'ont noté chez 33 espèces, alors qu'ils n'ont trouvé de sporophores verticillés que chez trois des espèces examinées ; cette dernière forme de l'appareil sporifère est par

conséquent très rare. Cependant, des espèces variantes très proches peuvent se différencier par la morphologie droite ou spiralée du sporophore, ce qui justifie son étude comme caractère différentiel supplémentaire.

L'involution et la plasticité de ces *Streptomyces* se rapprochent étroitement de celles des bactéries et confirment l'opinion actuellement admise par la plupart des microbiologistes *des propriétés évolutives de tous ces organismes.*

Depuis la publication des travaux de l'école de Gause, d'autres auteurs ont confirmé l'exactitude de leur conception. Ainsi, Burkholder et Ehrlich ont admis le même principe de détermination en 1954. Ils admettent comme premier critère de diagnostic taxonomique *la pigmentation du mycélium aérien et des spores*, puis *la coloration du mycélium végétatif ou du substrat de culture ;* le troisième critère est *la constitution morphologique des colonies examinées au microscope*, au point de vue de la structure des hyphes, du mycélium aérien, de l'appareil sporifère, de l'existence de chaînes de spores. Finalement, les auteurs ont recours aux propriétés physiologiques des espèces en étude.

C'est cette marche analytique que nous avons suivie pour la détermination de notre organisme mycosique. Cependant avant d'exposer nos travaux personnels, essayons de concrétiser les faits qui semblent se dégager des discussions surgies au cours du dernier demi-siècle au sujet de la systématique des Actinomyces.

Si Waksman n'a pas tenu suffisamment compte des caractères morphologiques et biochimiques pour classer ces organismes, il a cependant le grand mérite d'avoir ébauché un système taxonomique qui permet de grouper tous ces germes, qu'ils soient saprophytiques, pathogènes ou antibiogénétiques. Les auteurs russes, par contre, n'envisagent que les Actinomyces isolés du sol, de l'air et de l'eau. En élaborant les principes et méthodes expérimentales qui doivent permettre de les déterminer, il n'ont cependant fait qu'une œuvre partielle. Comme Langeron qui a divisé les Actinomyces pathogènes en sections et sous-sections, Gause et ses collaborateurs ont créé pour le classement des Actinomyces saprophytes et utiles des séries et groupes. Nous pensons qu'il aurait mieux valu employer la nomenclature officielle de la taxonomie botanique et cryptogamique, et de classer ces germes sans hésitation en familles, tribus, genres, sous-genres et espèces, en créant des noms génériques nettement justifiés. L'ensemble de la systématique des Actinomyces aurait ainsi largement gagné en clarté et précision. Bien que ne possédant ni la compétence ni l'autorité nécessaires pour réaliser cette rénovation taxonomique rationelle, nous avons cependant jugé utile d'établir, sur les bases élaborées par Waksman et ses élèves, une classification générale de ces Microsiphonées. Nous prévoyons ainsi la clé suivante :

Actinomycétacées (espèces le plus souvent pathogènes) :

Actinomyces : mycélium bien développé, non cloisonné,

aérobies ou micro-aérobies { acido-résistantes / cyanophiles.

Actinobactéries : mycélium peu développé, cloisonné et fractionné,

anaérobies strictes { acido-résistantes / cyanophiles.

Nocardia : mycélium cloisonné, se transformant en éléments d'arthrospores allongés ou cocciformes ; espèces appelées Proactinomyces par Krassilnikow. Nous préférons l'appellation Nocardia, faisant ressortir le caractère de pathogénéité de ces organismes.

Aérobies ou micro-aérobies { acido-résistantes / cyanophiles.

Streptomycétacées (espèces le plus souvent saprophytes et antibiogénétiques) :

Micromonospora : mycélium bien développé, formation des spores latéralement, le long des filaments (ancienne famille autonome de Waksman et Henrici).

Streptomyces : mycélium bien développé, non cloisonné ; présence d'appareils sporifères spéciaux : spiralés, droits ou verticillés.

Mésophiles ou psychrophiles { apigmentés
Aérobies ou micro-aérobies { pigmentés.

Thermostreptomyces : poussant entre 42° et 55°, autres caractères identiques à ceux du genre précédent.

En considérant cette clé de classification générale, nous voyons que l'étude que nous allons entreprendre concerne essentiellement un organisme à classer dans la famille des Streptomycétacées et dans le genre Streptomyces.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

CARACTÉRISATION DE L'ACTINOMYCES EN ÉTUDE

Le germe en expérience provenait de *prélèvements de sécrétion prostatique d'une orchi-épididymite granulomateuse pseudo-tumorale*, décrite par WALTER (72). Étant donné qu'il s'agissait d'une infection levurienne, les premières cultures ont été effectuées sur milieu PCB de l'*Institut Pasteur* (pomme de terre, carotte, bile). La bile est ajoutée comme agent antiseptique pour empêcher le développement d'un certain nombre de bactéries. Ce milieu est excellent pour l'étude des *champignons levuriformes*. Cependant, les premières cultures étaient très souillées, c'est pour cette raison que l'on a effectué un certain nombre de sous-cultures, principalement sur *milieu au moût de bière* et sur *milieu de Sabouraud glucosé*. C'est sur ce dernier substrat que nous avons constaté pour la première fois *la disparition des éléments levuriens par une lyse progressive*, phénomène qui nous a paru intéressant d'étudier de plus près.

L'intérêt de ce problème était encore renforcé par un fait signalé par *le docteur de* VRIES, du « *Centraalbureau voor Schimmelcultures* » *de Delft (Pays-Bas)*, auquel *notre maître* J. MEYER avait adressé des cultures du *Blastomycète* en question pour une détermination à titre de contrôle : *Les Candida ensemencés sur milieu de Sabouraud avaient complètement disparu au cours du transport à Delft et il ne restait plus qu'une culture d'Actinomyces.*

Nous avons, par la suite, essayé d'isoler ce germe à l'état de pureté pour entreprendre sa détermination selon les principes énoncés antérieurement.

Méthodes de culture et d'isolement:

L'isolement à l'état de pureté est obtenu sur milieu *Dextrose Starch Agar de Difco*, de composition :

Proteose peptone n° 3 Difco	15,0 g
Bacto-Dextrose	2,0 g
Soluble Starch Difco	10,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Disodium phosphate	3,0 g
Bacto-gelatin	20,0 g
Bacto-agar	10,0 g

On dissout 65 g de *Bacto Dextrose Starch Agar* dans 1 litre d'eau distillée froide, puis on chauffe à ébullition.

L'isolement était possible grâce à l'ajustement du milieu à un pH de 7,3 à 7,5. Nous avons ainsi obtenu des colonies pures d'*Actinomyces*, dont nous nous sommes servis pour l'étude détaillée qui va suivre.

Nous avons utilisé comme *milieu à base d'azote minéral* le substrat mentionné par GAUSE et décrit dans le chapitre précédent, et comme *milieu à base d'azote organique le Dextrose Starch Agar de Difco*. Ces deux milieux nous ont servi pour étudier la pigmentation des hyphes aériens et du mycélium végétatif selon le principe de GAUSE. Les cultures ont été effectuées à 28°.

Pour l'étude détaillée de notre organisme, nous avons eu recours à d'autres substrats, qui devaient nous permettre de déterminer les propriétés biochimiques et biologiques de l'organisme en question. Pour travailler dans des conditions toujours identiques, nous avons utilisé comme milieu de base celui de CZAPEK, substrat minéral synthétique :

Phosphate dipotassique	1,0 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Sulfate ferreux	0,01 g
Nitrate de sodium	2,0 g
Sucre	30,0 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1 000,0 cc

WAKSMAN recommandait déjà ce milieu en ramenant, selon les nécessités, la dose de sucre à 20 g.

Afin de nous mettre dans les conditions signalées par GAUSE en ce qui concerne la source d'azote organique, nous avons complété ce substrat minéral en y incorporant 1 % d'*Asparagine*, amide de l'acide

aspartique. Dans ces conditions, ce milieu se rapproche de celui de KRAINSKY, également utilisé par WAKSMAN, et qui est composé de :

Glucose	10,0 g
Phosphate dipotassique	0,5 g
Asparagine	0,5 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1 000,0 cc

Ces deux milieux nous ont servi pour l'étude de la fermentation et de l'assimilation des différents sucres, la dégradation de l'amidon et de la cellulose, le métabolisme protidique (sur les substrats de lait, de gélatine, de sérum et de blanc d'œuf), l'assimilation de l'azote (en présence de sulfate d'ammonium, nitrate de potassium, urée, asparagine, histidine et tyrosine).

Pour l'étude morphologique, nous avons employé nos deux milieux synthétiques pour examiner les éléments du thalle, de l'appareil sporifère, la structure du cytoplasme.

Nous allons tout d'abord donner les caractères morphologiques dont il faut tenir compte pour l'étude des Actinomyces.

Filaments mycéliens :

Les filaments mycéliens sont plus ou moins cylindriques et ont en moyenne 0,5 à 1 μ de diamètre. Pour beaucoup d'espèces, ils sont de deux types : filaments rampants ou immergés, et filaments aériens.

Filaments rampants sur milieu solide ou filaments immergés en milieu liquide :

Ils présentent un très petit diamètre; la paroi de ce mycélium est constituée par une membrane cireuse. Ces filaments ne sont pas cloisonnés ou, du moins, doivent être considérés comme tels. De toutes façons, s'il existe des cloisons, elles sont rares et ne peuvent intervenir comme caractères distinctifs de groupes ou d'espèces.

Le protoplasme contenu dans les filaments jeunes est continu. Lorsque ceux-ci vieillissent, il se fragmente et se concentre en certains points, au départ des ramifications et à l'extrémité de celles-ci, ou bien encore d'une façon très irrégulière à l'intérieur des filaments.

Ramifications :

Elles sont de plusieurs types, suivant leur mode de formation :

1° *Dichotomie :* Au point végétatif partent deux rameaux égaux, tout au moins au début de la végétation.

2° *Ramification latérale :* Il se forme sur la branche principale, au-dessous du point végétatif, une ramification à angle droit.

3° *Pseudo-dichotomie :* Il se forme une ramification latérale au-dessous de l'extrémité du rameau principal, puis cette ramification se développe rapidement et devient aussi importante que le rameau dont elle est issue, en même temps que l'angle, de droit, devient aigu.

Arthrospores :

Nous avons vu que, dans les filaments rampants ou immergés âgés, le protoplasme se fragmente. La paroi du filament peut s'affaisser puis disparaître entre les tronçons protoplasmiques.

D'autres fois on constate la disparition de cette membrane consécutivement au rétrécissement du diamètre du filament. Le résultat final est la constitution d'une chaînette de *Streptobacilles*. Ces formations ont le nom d'*arthrospores*.

En dehors des éléments normaux, on peut également trouver des *arthrospores irrégulières* qui se forment au point d'attache des ramifications. Après leur libération, ces arthrospores arrondissent leurs contours et se présentent sous forme de fragments ou de spores anormalement gros, rappelant des *Streptocoques*.

Spores latérales :

On constate souvent sur le côté d'un filament une courte ramification, dont l'extrémité devient plus réfringente par suite de la concentration du protoplasme. Cette extrémité peut alors se séparer par une sorte de gélification au niveau de son rattachement à la ramification. Ces éléments particuliers sont très fréquents chez tous les *Actinomyces saprophytes* et rappellent à la fois la formation d'*aleuries* ou de *conidies* chez les autres champignons inférieurs.

Petites massues :

Chez un certain nombre de *Microsiphonées* on observe la formation de ramifications latérales, courtes et à extrémité légèrement gonflée; ces éléments sont couramment désignés par le terme de « *petites massues* ». Celles-ci peuvent se fragmenter pour donner des *micro-arthrospores* qui sont sphériques et rappellent les Coques, assez fréquentes dans nos cultures initiales d'isolement.

Filaments spiralés ou vrilles :

Ces éléments se trouvent surtout chez les *Actinomyces saprophytes (Streptomyces) ;* ils rappellent les filaments enroulés, si fréquents chez les *Teignes*. Nous avons vu antérieurement que ces filaments spiralés se trouvent chez tous les *Streptomyces* (voir nos microphotographies).

Filaments aériens:

Ces filaments ont un diamètre supérieur à celui des filaments immergés, pouvant dépasser 1 μ. Ces filaments aériens sont généralement disposés perpendiculairement au milieu.

Endospores:

A la différence des fragments irréguliers des filaments immergés, le protoplasme des filaments aériens se condense également en fragments réguliers. Ces éléments ont reçu le nom de « *spores* » puisqu'ils sont plus résistants à la chaleur que les arthrospores. Ces *endospores* sont caractéristiques d'un certain nombre d'*Actinomyces* et permettent surtout de différencier ce groupe de microorganismes des *Corynebactériacées* et des *Mycobactériacées*.

En ce qui concerne le cycle évolutif et la reproduction sexuée des *Actinomyces*, nous renvoyons à Grigoraki (73), et pour la configuration des thalles à Duché.

Pour compléter *cette étude morphologique*, disons encore un mot sur *le cytoplasme*, la membrane et les noyaux des *Actinomyces*. Neukirch (74) a constaté le premier l'existence de *granulations métachromatiques* et Petit (75) a confirmé ses travaux en employant une méthode de coloration spéciale au *bleu de Nil*. En ce qui concerne l'existence de *noyaux*, la discussion entre les différentes tendances a duré jusque dans ces dernières années, mais leur existence ne fait actuellement plus de doute et leur différenciation d'avec les granulations métachromatiques est indubitable. *La membrane* des *Actinomyces* a une constitution très rapprochée de celle des *Mycobactéries* et contient une forte proportion de matières grasses et de cires qui ont pu être extraites par un épuisement au chloroforme; l'extrait chloroformique contient de l'*acide mycolique* en fortes proportions.

Après ces données générales, nous passons à la description détaillée de l'espèce isolée en étude.

Description du germe en étude:

Sur les deux milieux de base nous avons pu constater les faits suivants :

Sur le milieu minéral : mycélium aérien blanc jaunâtre à aspect lisse; mycélium végétatif blanchâtre, prenant un léger reflet jaunâtre en vieillissant. Pas de diffusion du pigment dans le substrat gélosé.

Sur le milieu organique : mycélium aérien blanchâtre ou jaunâtre, moins luxuriant que sur le milieu précédent; mycélium végétatif incolore ou jaunâtre. Pas de pigmentation du substrat.

Sur les deux milieux, les colonies se rejoignent très lentement et la formation d'un voile homogène devient apparente seulement après la 3e semaine (voir fig. 1).

Les prélèvements effectués sur ces milieux ont montré à l'examen microscopique un pourcentage très élevé de filaments spiralés, avec un nombre de spirales allant de 3 à 8 par vrille (voir fig. 9 et 10).

Les arthrospores apparaissent assez rapidement, surtout sur le milieu organique; elles sont allongées ou ovalaires, mesurant 1,6 à 2,1 μ sur 0,7 à 1,2 μ. En ce qui concerne la formation *des endospores*, *des spores latérales et des éléments en massue*, nous renvoyons à la description ci-dessus.

Milieu de Czapek glucosé asparaginé :

Mycélium aérien peu ramifié, formant très rapidement des *arthrospores*. La taille de ces filaments est de 0,6 à 1 μ de diamètre. *Endospores* ovalaires. Il y a continuité parfaite entre le mycélium aérien et le mycélium végétatif. Le milieu se trouble par des flocons qui tombent au fond du tube à partir du 6e au 8e jour. Le voile à la surface du milieu est efflorescent, blanc jaunâtre, avec, vers les parois du tube, un anneau à reflets brunâtres. La culture dégage une odeur de moisi; le substrat liquide reste très longtemps inchangé et c'est seulement vers la 3e semaine qu'on note une légère teinte jaunâtre. Après un mois d'observation, le pH, initialement ajusté à 7,4, a viré vers la zone acide (6,6).

Milieu de Czapek glucosé, asparaginé, gélosé :

Les colonies se développent très lentement et vers le 8e jour, on note un affaissement du centre de la colonie ; à ce moment apparaissent les filaments aériens blanchâtres, devenant par la suite légèrement jaunâtres. Les bords des colonies deviennent jaune-brunâtre ; le pigment diffuse dans le substrat, qui devient également jaunâtre (voir fig. 4).

Milieu de Czapek glycériné gélosé :

Les colonies sont très chétives et se couvrent rapidement d'hyphes aériens blanchâtres. Les colonies de la taille d'une tête d'épingle dépassent à peine la surface du milieu. On ne note pas de pigment diffusible, ni d'odeur de moisi.

Milieu de Czapek glucosé gélosé :

Le développement est chétif, les colonies sont plus ou moins punctiformes et présentent rapidement des hyphes aériens blanchâtres. En vieillissant, les colonies atteignent un diamètre de 0,5 à 1,2 mm et présentent un bord jaunâtre se prolongeant dans la profondeur du milieu par des filaments en crampons. Pas de diffusion du pigment, faible odeur de moisi (voir fig. 1).

Milieu de Czapek maltosé gélosé :

Développement un peu plus abondant que sur le milieu glucosé, odeur faible de moisi. Pas de diffusion du pigment dans le milieu.

Milieu de Czapek lactosé gélosé :

Colonies incolores, atteignant 1 à 1,3 mm vers le 10^{e} jour, à aspect lisse. Faible odeur de moisi ; pas de diffusion du pigment.

Milieu de Czapek saccharosé gélosé :

Colonies blanchâtres, atteignant 0,8 à 3 mm de diamètre vers le 10^{e} jour, avec une cupule centrale entourée d'un anneau d'hyphes aériens blanchâtres.

Milieu de Czapek lévulosé gélosé :

Colonies punctiformes, blanchâtres, évoluant très peu, faible odeur de moisi ; pas de diffusion du pigment.

Milieu de Czapek galactosé gélosé :

Aspect morphologique de la culture sensiblement comparable à celui sur milieu glucosé ; colonies blanchâtres au début, à reflets jaunâtres ensuite ; odeur de moisi ; pas de diffusion d'un pigment dans le milieu.

Milieu de Czapek raffinosé gélosé :

Développement insignifiant, rares colonies punctiformes, humides, incolores. Odeur nulle ; pas de diffusion du pigment dans le milieu.

Auxanogramme de l'azote:

Nous avons étudié l'assimilation des produits azotés sur milieu au chlorure d'ammonium, nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium, asparagine, histidine, peptone, tyrosine et urée, en nous servant toujours du milieu de CZAPEK comme substrat de base et en remplaçant le nitrate de sodium par les différentes substances à étudier. Nous exprimons dans le tableau ci-dessous les résultats obtenus :

TABLEAU N° 4

Auxanogramme	Germe en étude				
	Développement	Aspect macroscopique	Odeur	Pigment	Exopigment
Chlorure d'ammonium.	insignifiant	humide	nulle	incolore	—
Nitrate d'ammonium .	satisfaisant	lisse avec cupule	moisi	jaunâtre	+
Sulfate d'ammonium ..	insignifiant	humide	nulle	incolore	—
Asparagine	satisfaisant	lisse, plissé sur le bord	moisi	jaune verdâtre	+
Histidine	satisfaisant	lisse, plissé sur le bord	moisi	jaune verdâtre	+
Peptone	luxuriant	lisse, plissé sur le bord	moisi	jaunâtre	+
Tyrosine	satisfaisant	lisse	nulle	jaune orangé	+
Urée	insignifiant	humide	nulle	incolore	—

Interprétation :

De ces expériences on peut conclure que notre Streptomyces *est incapable d'assimiler l'azote ammoniacal ;* cependant ces sels ne constituent pas des inhibiteurs de croissance, puisque l'organisme assimile le *nitrate* d'ammonium et peut constituer ses substances protidiques à partir de l'azote qu'il trouve sous forme de nitrate.

Quant *aux acides aminés et aux amides*, nous voyons que *l'asparagine, l'histidine et la tyrosine* peuvent servir de base pour le métabolisme azoté de notre organisme, alors qu'il ne peut pas tirer profit de *l'urée*. Sa croissance est assez luxuriante sur milieu peptoné.

Propriétés biochimiques:

En ce qui concerne l'élaboration *d'enzymes protidolytiques*, nous avons eu recours aux milieux suivants : lait écrémé, blanc d'œuf coagulé, gélatine et sérum coagulé. Dans le tableau ci-dessous nous rapportons les résultats obtenus :

TABLEAU N° 5

Lait		Gélatine	Blanc d'œuf coagulé	Sérum coagulé
coagulation	peptonisation			
—	+++	liquéfaction rapide	liquéfaction	liquéfaction +++

On voit que l'organisme a *un pouvoir protidolytique très prononcé ;* il faut mentionner que le pigment est variable d'un milieu à l'autre: ainsi, sur le lait écrémé, le milieu prend rapidement une teinte jaune rougeâtre; sur le milieu à la gélatine il ne se forme pas d'exopigment, alors que le substrat au blanc d'œuf devient brun et le sérum coagulé présente une fluorescence verdâtre.

Pouvoir réducteur:

Nous avons recherché *le pouvoir réducteur* vis-à-vis *des nitrates, du rouge neutre et par la production d'hydrogène sulfuré.* Pour les deux premières réactions, nous avons eu recours au milieu de Czapek ; en ce qui concerne la production d'H^2S, nous avons employé les milieux au plomb et à la cystine, c'est-à-dire des milieux contenant le soufre sous forme de sel sulfureux minéral d'une part, et le soufre organique d'autre part. Le premier milieu synthétique avait la composition suivante :

Chlorure de calcium	0,40 g
Phosphate acide de potasse	2,50 g
Sulfate ferreux	0,10 g
Asparagine	4,00 g
Glucose	15,00 g
Eau distillée	1 000,00 cc
Hyposulfite de soude	5,00 g

Le second milieu se prépare de la même façon, *mais nous avons remplacé l'hyposulfite de soude par* 1 *g de cystine.* Il faut ajouter une trace de *sulfhydrate d'ammonium* comme réducteur pour éviter l'oxydation spontanée de la cystine.

On complète les deux milieux par addition de 25 g °/₀₀ de gélose ; on chauffe à l'autoclave et on laisse refroidir à 45°. Puis on ajoute 5 cc d'une solution d'acétate de plomb à 10 %. On laisse solidifier en position verticale, il faut donc ensemencer par piqûre. Nous enregistrons les résultats dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° 6

Pouvoir réducteur		Production d'H^2S	
Nitrate	Rouge neutre	Soufre minéral	Soufre organique
+	+	—	+

On voit que notre organisme a un pouvoir réducteur assez prononcé ; s'il réduit *les nitrates en nitrites*, nous n'avons pas pu constater de dégradation plus poussée en cherchant *l'ammoniaque.* Quant à la production d'H^2S on voit que le réactif au plomb ne constitue pas un facteur inhibiteur de croissance, puisque la réaction a été positive sur milieu à base de cystine, preuve que *le Streptomyces en étude* n'attaque pas l'hyposulfite de soude.

Dégradation des matières amylacées:

Pour contrôler l'attaque des substrats amylacés, nous avons employé les milieux suivants :

Gélose à l'amidon:

Amidon soluble	10,0 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Phosphate dipotassique	2,3 g
Carbonate de magnésium	1,0 g
Chlorure de sodium	0,5 g
Eau ordinaire	1 000,0 cc
Gélose	30,0 g

pH = 7,2 — 7,4

Milieu à la cellulose :

Phosphate dipotassique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Chlorure de sodium	0,5 g
Sulfate ferreux	0,01 g
Eau ordinaire	1 000,0 cc

pH = 7,2

Le milieu est réparti à raison de 30 cc dans des tubes de Borel, dans lesquels on fait plonger des bandes de papier-filtre selon la technique de WAKSMAN.

Les deux milieux étaient observés pendant 8 semaines tous les 5 jours. L'hydrolyse de *l'amidon* se manifeste dès le 5e jour de la culture et le 10e jour, la réaction est fortement positive. Quant *à la cellulose*, nous n'avons pas constaté de dégradation après les deux mois d'observation de la culture, malgré un développement satisfaisant de l'organisme.

Nous avons complété cette étude d'utilisation *des matières amylacées* en cultivant *le Streptomyces* sur les milieux végétaux suivants :

Eau de pomme de terre à pH = 7,2 :

Apparition des colonies à la surface dès le 3e jour, formant progressivement un anneau sur les parois du tube, constitué par des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, et ceci vers le 10e jour. A la même époque on note à la surface du milieu un voile homogène, blanchâtre, formé par des hyphes aériens. Le voile se déchire et il se forme des flocons plus ou moins sphériques qui tombent au fond du tube ; le voile se renouvelle régulièrement et le milieu de culture conserve sa teinte légèrement jaunâtre. La culture dégage une odeur de moisi. Après 30 jours le pH est tombé à 6,8.

Eau de carotte :

L'aspect morphologique de notre organisme est sensiblement identique à celui du milieu précédent, cependant la culture dégage une odeur fruitée.

Pomme de terre glycérinée gélosée :

Croissance assez luxuriante, les colonies atteignent 1,5 à 2,5 mm de diamètre au bout de la première semaine de culture ; elles sont crémeuses, blanches et deviennent plus tard gris-verdâtre. Les colonies isolées sont à centre surélevé, irrégulièrement plissées à la périphérie. La culture dégage une odeur de moisi. Diffusion d'un pigment dans le substrat nutritif, lui donnant d'abord une teinte verdâtre, virant avec le vieillissement vers le noir.

TABLEAU N° 7

Propriétés biochimiques	Streptomyces			
	albus	albidoflavus	lieskeï	à déterminer
Pigment (milieu minéral) .	blanc	blanc-jaunâtre	jaunâtre	blanc-jaunâtre
(milieu organique)	blanc	incolore	crème	blanchâtre
Exopigment				
(milieu minéral)	—	—	jaune-verdâtre	—
(milieu organique)	—	jaune-brunâtre	jaune	—
Aspect en eau de pomme de terre :				
voile	+	+	+	+
dépôt	+	+	+	+
exopigment	+	+	+	—
Auxanogramme des glucides:				
glucose	++++	+	+++	++
galactose	++	+	++	++
saccharose	+++	++	+++	++
maltose	++	++	+++	+++
lactose	+	+	+	++
raffinose	±	—	+	±
lévulose	++	+	++	±
Auxanogramme de l'azote :				
Chlorure d'ammonium .	+	—	+	—
Nitrate d'ammonium ..	++	+	+++	++
Sulfate d'ammonium ..	+	—	+	—
Asparagine	++	+++	++	+++
Histidine	+	+	+	++
Tyrosine	++++	++	+++	++
Peptone	+++	+++	+++	+++
Urée	+	+	?	—
Enzymatologie :				
Caséase	—	—	—	—
Tryptase	++	+	+	+++
Gélatinase	+++	+++	+++	+++
Protéase	+	+++	+++	+++
Amylase	±	++	++	+++
Cellulase	—	?	?	—
Pouvoir réducteur :				
Nitrates	+	+	+	+
Rouge neutre	—	+	+	+
H^2S (minéral)	—	+	—	—
(organique)	—	+	+	+

Carotte glycérinée gélosée :

Aspect sensiblement identique à celui du milieu précédent ; développement un peu moins luxuriant : l'odeur fruitée se dégage également, mais la pigmentation du milieu fait défaut.

Nous récapitulons toutes les propriétés de notre organisme dans un tableau comparatif avec trois germes rentrant dans *la série* (*genre*) *des Streptomyces albus* (voir page 46).

En effet, d'après la classification de GAUSE notre organisme rentre dans cette série. Nous avons choisi les trois germes de comparaison qui, par leurs caractères, se rapprochaient le plus du nôtre.

En considérant ce tableau, on voit que *l'organisme en étude* se rapproche le plus de *Streptomyces lieskei ;* il s'en différencie cependant par l'aspect morphologique du *mycélium aérien* et des *sporophores*, puis par l'absence de *pigment diffusible* dans le milieu minéral ou organique. Le même fait s'observe dans l'eau de pomme de terre. Au point de vue *dégradation des sucres*, les propriétés des deux organismes sont sensiblement identiques, sauf pour le lévulose.

En ce qui concerne *l'utilisation des substances azotées*, *notre Streptomyces* est incapable d'employer l'azote ammoniacal, alors que *Streptomyces lieskei* se développe sur milieu au chlorure d'ammonium et au sulfate d'ammonium.

Les propriétés enzymatiques sont sensiblement identiques; quant *au pouvoir réducteur*, les deux organismes agissent de même.

Si nous ne pouvons pas homologuer notre germe avec Streptomyces lieskei il nous est cependant permis de conclure qu'il est beaucoup plus proche de cette espèce que de Streptomyces albus et albidoflavus.

Par la suite, nous avons utilisé *notre germe pour déterminer son pouvoir antibiotique* vis-à-vis de deux bactéries et surtout vis-à-vis de quelques champignons inférieurs.

Légendes :

Fig. 1. Tube a : Str. albidoflavus; tube b : Str. liskeï; tube c : Str. en étude (Dr Blum).

Cultures sur milieu de Czapek glucosé, gélosé, âgées de 6 semaines.

Fig. 2. Str. albidoflavus. Colonies géantes en boîte de Petri.

a) Culture sur milieu de Czapek glucosé, asparaginé.

b) Culture sur milieu de Czapek maltosé (ronds de sorcière), âgées de 6 semaines.

Fig. 3. Str. liskeï. Colonies géantes en boîte de Petri.

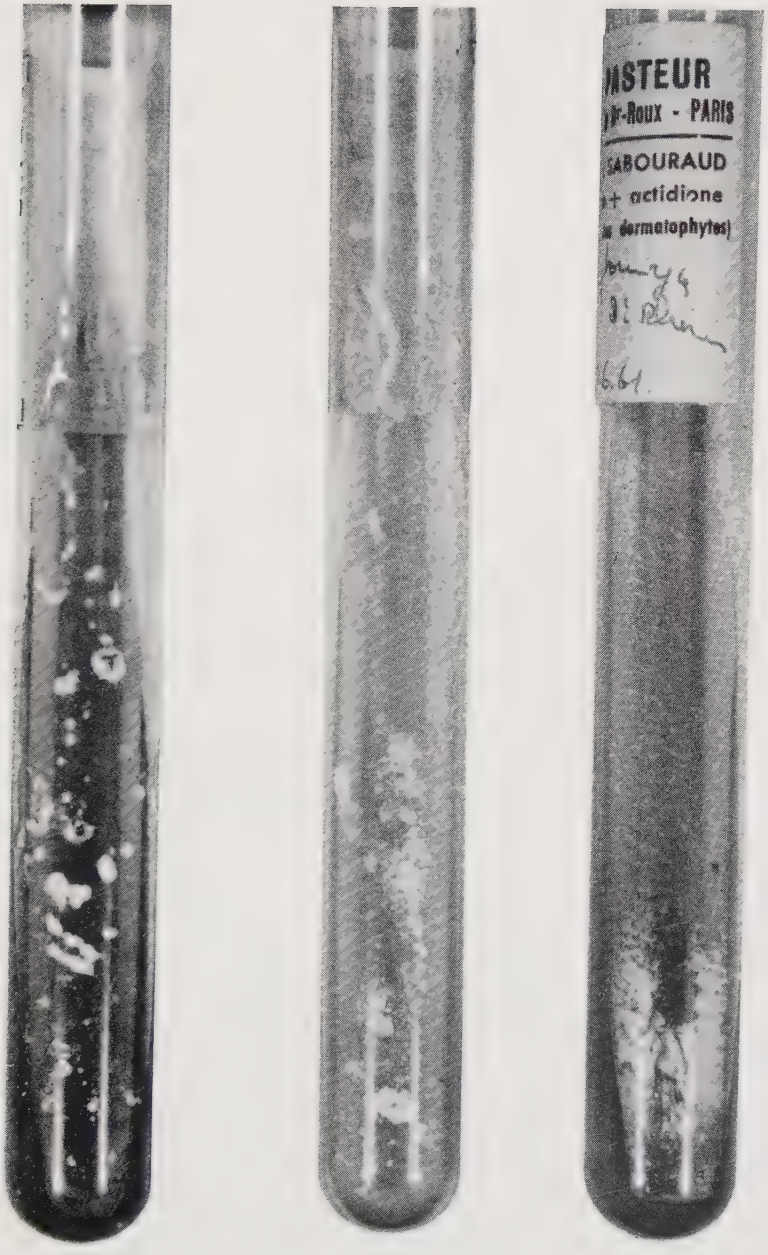
a) Culture sur milieu de Czapek glucosé, asparaginé.

b) Culture sur milieu de Czapek maltosé, âgées de 4 semaines.

Fig. 4. Str. en étude. Colonies géantes en boîte de Petri.

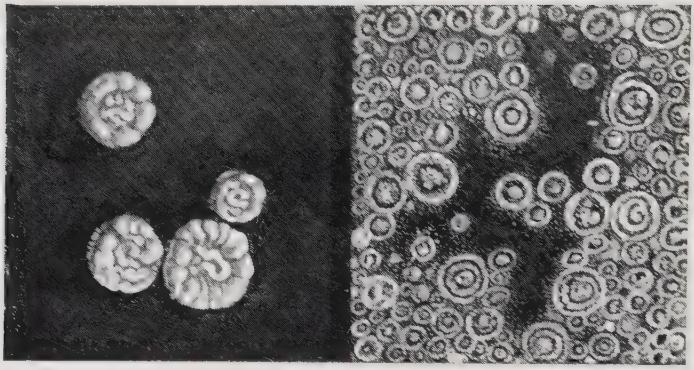
a) Culture sur milieu de Czapek glucosé, asparaginé.

b) Culture sur milieu de Czapek maltosé, âgées de 6 semaines.



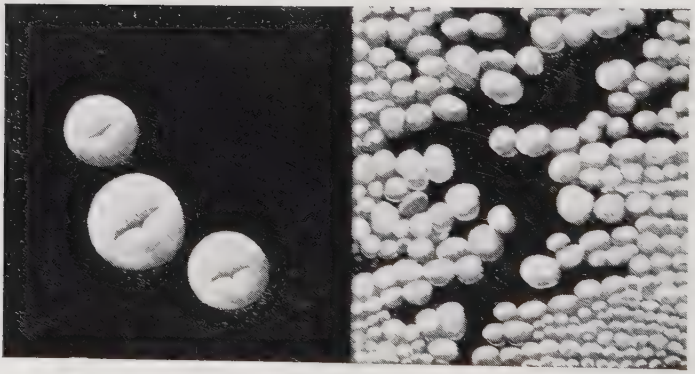
a *b* *c*

Fig. 1



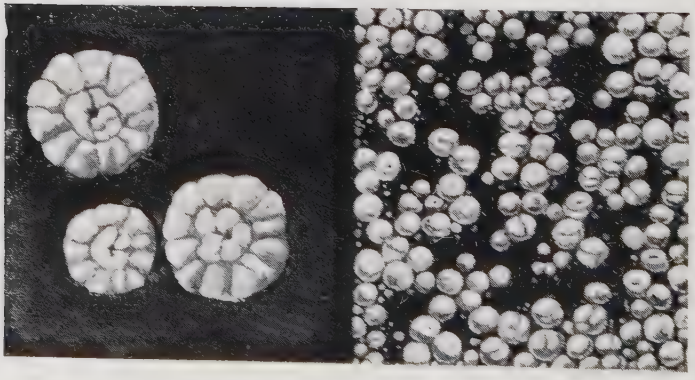
a *b*

Fig. 2



a *b*

Fig. 3



a *b*

Fig. 4

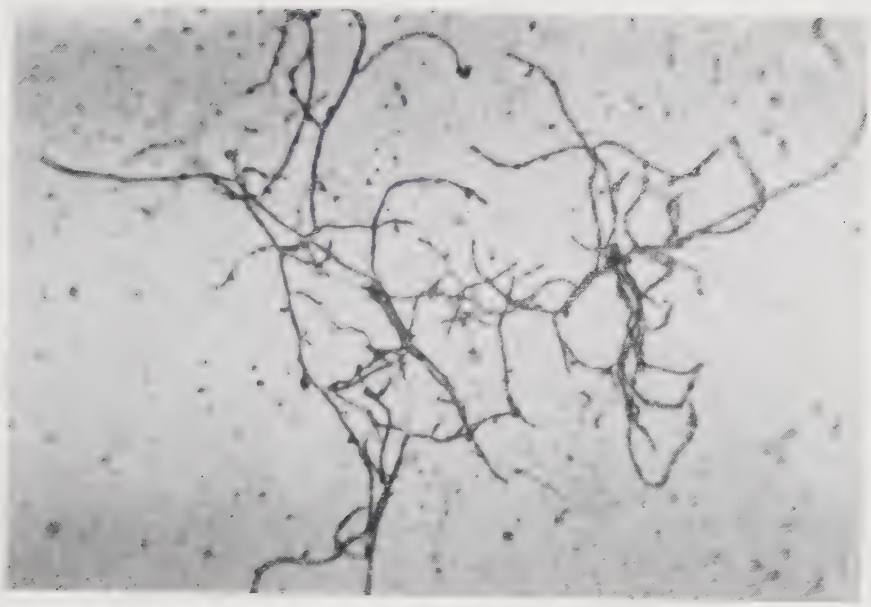


Fig. 5
Streptomyces albidoflavus : formation d'arthrospores et ramification dichotomique ou verticillée.

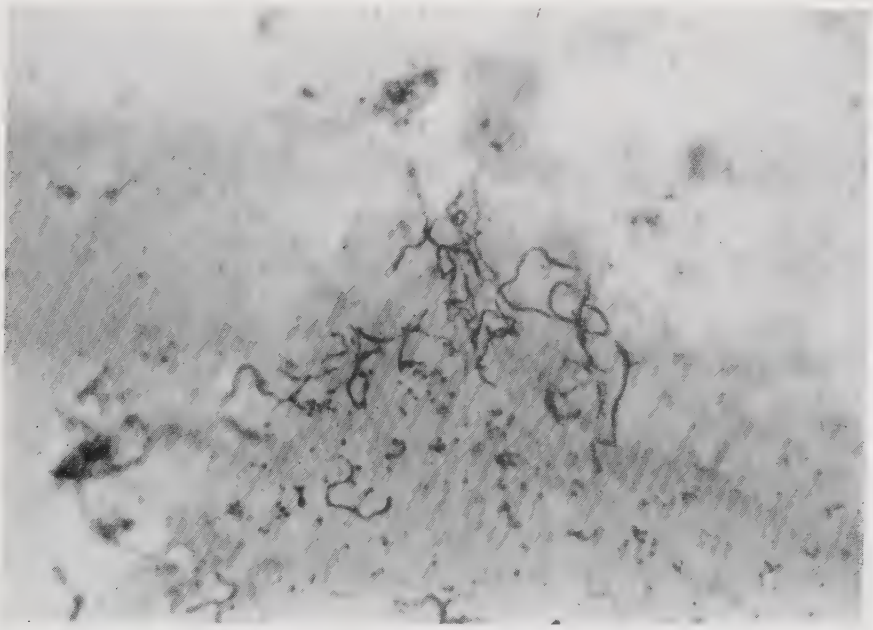


Fig. 6
Streptomyces albidoflavus : formes spiralées à peine ébauchées.

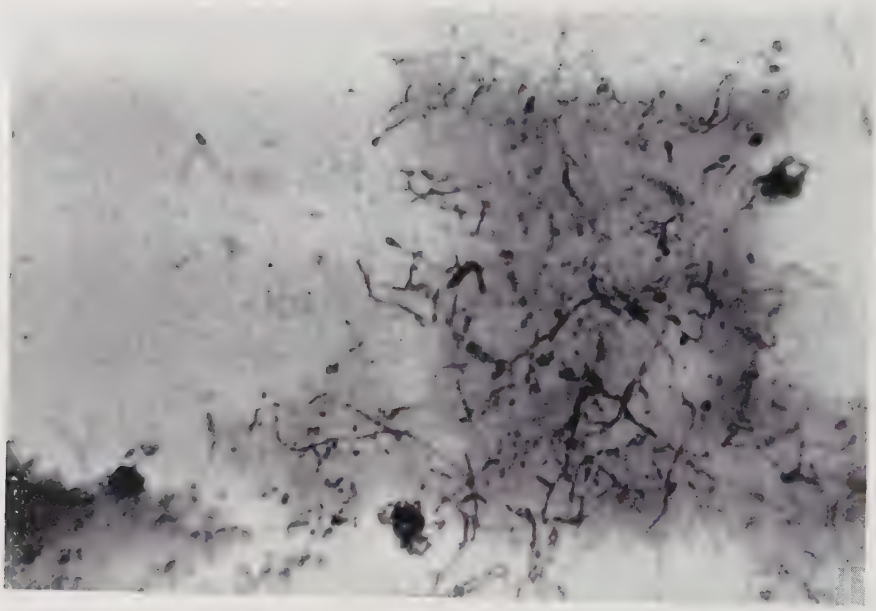


Fig. 7
Streptomyces liskeï : formations d'arthrospores et formes en massue.

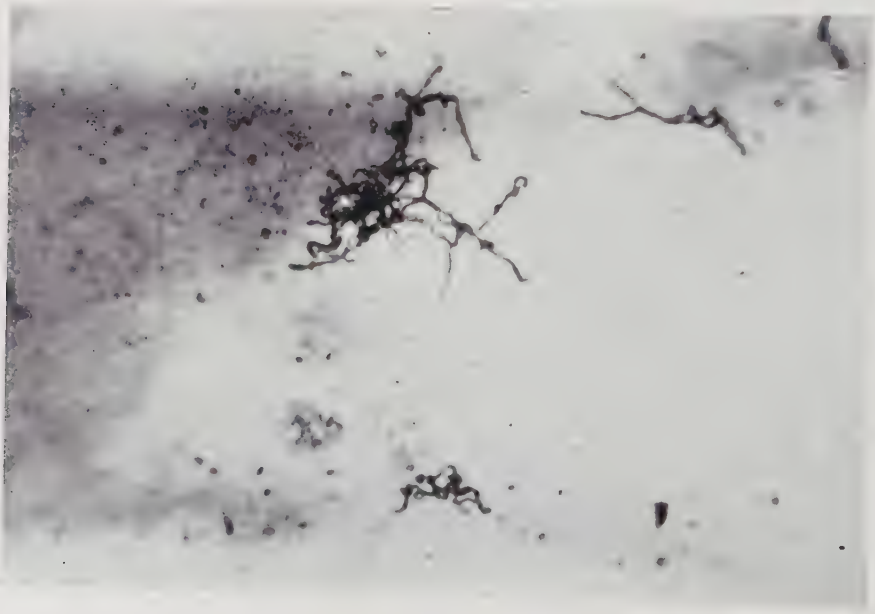


Fig. 8
Streptomyces liskeï : formes spiralées de culture jeune (3 jours).

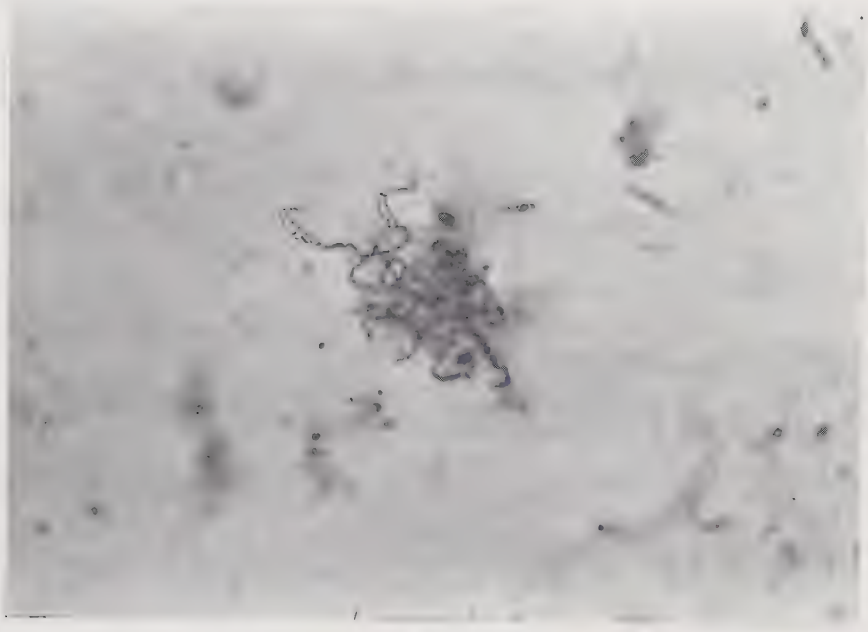


Fig. 9
Streptomyces en étude : formes spiralées nettement développées.

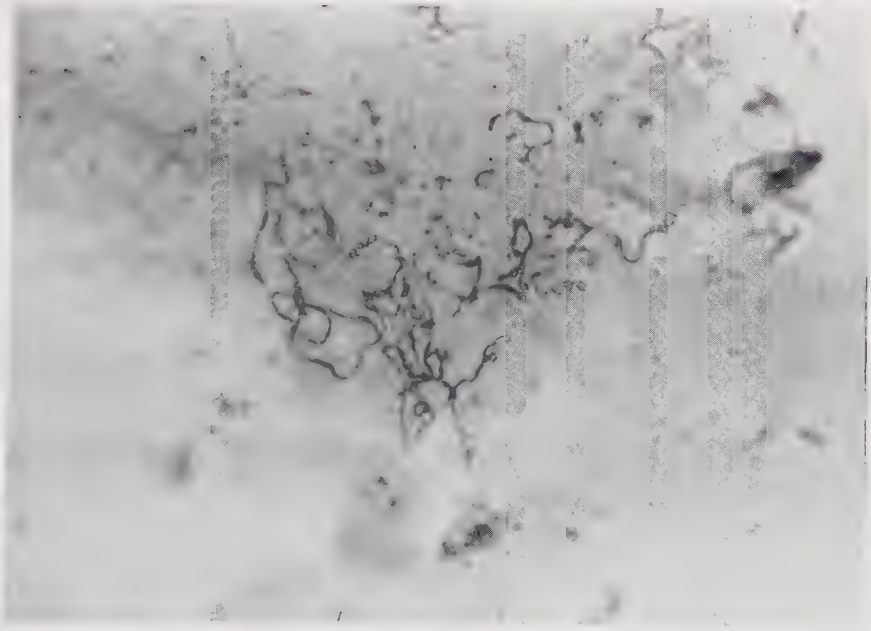


Fig. 10
Streptomyces en étude : formations d'arthrospores et de massues; jeunes formes spiralées.

CHAPITRE V

ÉTUDE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DE NOTRE STREPTOMYCES

Le principe général de la classification des antibiotiques repose sur leur action contre les *bactéries Gram-positives*, les *bactéries Gram-positives et Gram-négatives*, les *bactéries Gram-négatives*, les *rickettsies* et *les virus*, les *levures* et les *champignons filamenteux* et contre les *protozoaires*, les *insectes ou les deux ensembles.*

WAKSMAN donne deux clés pour la détermination des antibiotiques strepromycétiques. *Dans la première*, les antibiotiques sont envisagés suivant *leur solubilité dans l'eau et les solvants organiques.* La seconde clé distingue les différents antibiotiques suivant les *zones d'absorption spectrophotométrique à des longueurs d'ondes données.*

En ce qui nous concerne, nous ne considérons que les *antibiotiques actifs contre les champignons inférieurs* et nous nous rapportons à la première clé puisque nous n'avions pas de spectrophotomètre à notre disposition.

WAKSMAN distingue ainsi la *Fracidine*, l'*Ascosine*, la *Candicidine B et A*, les trois premières insolubles dans l'eau, alors que la dernière est hydrosoluble ; *l'Actinon*, *la Nystatine*, *l'Antimycoïne*, *la Chromine et la Microsine A et B*, toutes insolubles dans l'eau et différemment actives vis-à-vis des champignons. Toutes ces substances antibiotiques sont plus ou moins colorées en jaune ou en verdâtre.

Parmi les antibiotiques non colorés, WAKSMAN cite : *l'Antimycine A*, *l'Endomycine*, *l'Hélixine*, *la Musarine*, *la Cyclohéximide*, *la Rimocidine*, *la Phéofasine*, *la Rotaventine*, *la Moldine*, *la Mycéline*, *la Cacaomycétine* et différents autres facteurs antilevuriens. Tous ces antibiotiques se différencient soit par leur solubilité dans l'eau, dans l'éther et les autres solvants organiques, soit par leur activité vis-à-vis des *levures ou des dermatophytes.*

Recherche du pouvoir antibiotique du substrat de culture:

Pour réaliser ces expériences, nous avons préparé des cultures de *notre Streptomyces* en milieu de CZAPEK à l'asparagine ; nous avons employé des fioles de Fourneau contenant 500 cc de milieu et des fragments de lames de rasoir inoxydables. Le tout a été stérilisé et en-

semencé avec une suspension de *notre Streptomyces* cultivé pendant 8 jours sur milieu solide. Après 20 jours de culture, on agite mécaniquement pour disloquer le mycélium cryptogamique et pour réaliser une suspension aussi homogène que possible. On laisse déposer, puis on décante la partie supérieure à travers un filtre Chardin retenant les éléments fongiques finement hachés. Le filtre est mis de côté pour servir ultérieurement à recueillir la plus grande partie *du mycélium streptomycétique* resté initialement dans la fiole de Fourneau et que nous reprenons avec de l'eau distillée stérile.

La phase liquide des cultures de dix fioles a été réunie et conservée provisoirement en présence de toluène. Au départ, ce filtrat avait un pH de 4,8. Pour vérifier son activité antibiotique, nous avons préparé des cultures de *Candida albicans et de Ctenomyces mentagrophytes* en milieu liquide ; au bout de trois jours, nous avons introduit dans ces cultures le filtrat streptomycétique dans la proportion de 1/100 et avons contrôlé le développement de nos deux organismes-test à l'aide de la cellule photoélectrique. Nous avons ainsi pu constater que ce filtrat avait un pouvoir fongistatique pour les deux organismes.

Recherche du pouvoir antibiotique dans le résidu mycélien:

Le résidu mycélien a été déshydraté dans le vide sous anhydride phosphorique, puis pulvérisé. Il a alors été épuisé cinq fois par 100 fois son poids d'eau distillée. L'extrait ainsi obtenu a été concentré par distillation sous vide à environ 1/20 de son volume initial, donnant un liquide trouble et ambré, avec lequel les essais sur des cultures de champignons-test ont montré une forte action antibiotique.

Ayant ainsi constaté que l'antibiotique est endo- et exocellulaire dans les substrats aqueux, nous avons recherché des méthodes de purification de ces extraits bruts.

Essai de purification de l'extrait brut:

Le filtrat du milieu de culture et l'extrait aqueux du mycélium ont été additionnés de 2 % d'acide acétique cristallisable jusqu'à un pH de 3,4 à 3,6. Les liquides acidifiés ont ensuite été placés pendant 48 heures à la glacière et agités à plusieurs reprises. Après ce temps, il se forme un précipité que nous avons séparé par filtration et le filtrat limpide a été amené à pH = 7,4 au moyen d'ammoniaque. Cette manipulation fait apparaître un précipité jaune floconneux ; on filtre et à un échantillon de ce filtrat on ajoute une trace d'ammoniaque pour contrôler s'il n'apparaît plus de précipité. Le précipité, repris en solution aqueuse, a été acidifié à pH = 4,5, on filtre et la solution ainsi obtenue est ramenée à pH = 7,4 par l'ammoniaque puis chauffée entre 35° et 40° pendant 10 minutes pour obtenir une précipitation totale de la fraction antibiotique active. On laisse reposer pendant 24 heures pour permettre la

sédimentation du précipité qu'on reprend par agitation, puis on filtre. Le résidu sur le filtre est lavé à plusieurs reprises au moyen d'eau alcalinisée par l'ammoniaque. Finalement, le filtre contenant le précipité est séché dans le vide à 37°. *Le rendement brut ainsi obtenu a été de 0,47 %.*

Une petite fraction de ce précipité est remise en solution dans l'eau légèrement acidifiée et employée pour le contrôle du pouvoir antibiotique. Ce dernier s'est avéré positif pour *Candida albicans* et *Ctenomyces mentagrophytes*, tant pour le produit extrait du filtrat de milieu de culture que de l'extrait aqueux de mycélium.

Pour pousser plus loin la purification du produit antibiotique, le précipité jaune obtenu en solution ammoniacale est repris par le *dioxane*. On utilise pour cela une fraction d'environ 5 cc de dioxane, on porte à 50° et on laisse en contact pendant 2 heures.

On décante sur un filtre et l'on répète six fois l'extraction au dioxane. L'extrait ainsi obtenu étant de couleur jaune, on ajoute 2 g de *charbon animal activé Merck* et on laisse en contact pendant 16 heures. En filtrant soigneusement on obtient une solution presque incolore que l'on évapore sous vide, ce qui donne un petit résidu pulvérulent, de couleur crème. Ce résidu est enfin recristallisé dans une solution de 2 3 de méthanol et de 1 3 d'eau distillée. On chauffe à 50°, on filtre sur un verre fritté et l'on place au réfrigérateur dans un bécher.

Après trois jours, une partie du solvant s'est évaporée, laissant sur les bords du bécher une couronne cristalline blanche. On décante et l'on recueille la petite quantité de produit ainsi purifié.

Le produit cristallin ainsi obtenu a été éprouvé quant à son pouvoir antifongique, qui était *positif pour Candida albicans*, mais *négatif pour Ctenomyces mentagrophytes*. Le pouvoir antifongique était nettement plus faible que celui du produit brut.

Ce procédé de purification a été employé aussi bien sur l'antibiotique non purifié extrait du mycélium que sur celui précipité du milieu de culture.

Propriétés de l'antibiotique purifié:

Pour la détermination du *point de fusion*, nous avons eu recours à la microméthode : le P.F. est encore imprécis puisque nous notons le début d'une fusion lente à 212°5 et une fusion totale à 241°. Le produit reste également en surfusion pendant 24 heures et présente deux phases, l'une liquide et l'autre formée de petits cristaux prismatiques.

En ce qui concerne les caractères chimiques, nous avons traité la solution aqueuse faiblement acidifiée des cristaux par les réactifs suivants :

Chlorure mercurique : précipité blanc.

Ferrocyanure de potassium en milieu acide : précipité jaunâtre.

Solution iodo-iodurée : précipité brun.
Réactif d'Esbach : précipité jaune.
Réaction de Tanret et Meyer : précipité blanc.

Les cristaux obtenus en solution d'alcool méthylique sont stables à la température ordinaire. Ils présentent cependant des propriétés hygroscopiques assez prononcées si on les conserve à l'air. Ce corps est insoluble dans l'éther et l'éther de pétrole, il est peu soluble dans l'alcool méthylique et éthylique. Il présente en outre une solubilité partielle dans la glycérine et le propylène-glycol. En substrat aqueux légèrement acide (pH = 5,0) il est entièrement soluble. En solution aqueuse d'acide acétique à 1 % le pouvoir rotatoire à 20° est de (α) D = — 32° à — 34°.

L'analyse élémentaire a donné la composition suivante : $C^{44}H^{74}O^{28}N$. Un autre échantillon a fourni le résultat suivant : $C^{44}H^{78}O^{30}N$.

En milieu acidifié à pH = 4,5 nous avons pu constater un phénomène d'hydrolyse en chauffant à 45° pendant 60 minutes. La solution ainsi traitée a réduit le réactif de Fehling. Nous avons essayé d'élucider ce problème.

Essai d'hydrolyse:

Un gramme de notre substance antibiotique a été traité au réfrigérant à reflux au moyen de 30 cc d'acide chlorhydrique normal pour procéder à l'hydrolyse partielle. Celle-ci est pratiquée pendant 4 heures au bain-marie bouillant. On perçoit dans ces conditions l'apparition d'un précipité dans le liquide initialement limpide. On filtre pour recueillir le filtrat dans lequel on essaie de caractériser les glucides. On neutralise au moyen d'une solution de carbonate de baryum, puis on concentre le liquide dans le vide à 60° et on ramène finalement le résidu sirupeux à un volume de 100 cc au moyen d'eau distillée.

Identification du glucose :

On sait que par leur fonction aldéhyde ou cétone, les aldoses et les cétoses (CH^2OH — $(CHOH)^3$ — CHOH — CHO) réagissent à froid sur une molécule de phénylhydrazine. Les hydrazones obtenues sont, par exemple, le glucosephénylhydrazone : CH^2OH — $(CHOH)^3$ — CHOH — CH = N — NHC^6H^5.

L'hydrazone ainsi formé, chauffé avec un excès de phénylhydrazine, perd deux atomes de H de la fonction alcoolique voisine de la fonction hydrazone, de telle sorte que cette fonction alcoolique se transforme en fonction cétonique. Par exemple :

CH^2OH — $(CHOH)^3$ — CHOH — CH = N — NHC^6H^5
CH^2OH — $(CHOH)^3$ — CO — CH = N — NHC^6H^5.

Il y a ainsi formation d'une osazone :

$$CH^2OH — (CHOH)^3 — CO — CH = N — NHC^6H^5 + NH^2 — NHC^6H^5$$
$$CH^2OH — (CHOH)^3 — C — CH = N — NHC^6H^5$$
$$\quad\quad\quad

en présence de 0,2 g de o-toluyl-hydrazine dans 15 cc d'alcool. On filtre à chaud sur un filtre mouillé à l'alcool. Après refroidissement, on obtient un précipité cristallin blanchâtre, de 40 à 42 mg de galactose-o-toluyl-hydrazone, présentant un point de fusion de 72°.

Identification du rhamnose :

On sait que *Saccharomyces cerevisiae en culture pure* fermente le glucose et le galactose, mais est sans action sur le rhamnose. Nous avons ainsi utilisé la solution glucidique d'hydrolyse traitée par une suspension de *Saccharomyces cerevisiae* à 2 %. Après 5 heures de séjour à l'étuve, nous nous sommes assuré, par un échantillon témoin, que le glucose et le galactose avaient disparu. Le liquide fermenté débarrassé de ces deux sucres a été examiné quant à la présence de *rhamnose*. Il réduisait toujours *la liqueur de Fehling*, nous avons donc effectué l'identification du sucre restant en préparant les produits d'addition caractérisés par leur constante physique et microscopique et par la préparation de phénylhydrazones, de semi-carbonazones et d'oxines. Nous avons procédé de la façon suivante :

Préparation d'un phénylhydrazone :

On mélange :

Eau	5,0 cc
Phénylhydrazine	2,0 cc
Solution aqueuse à 60 % d'acide acétique crist.	3,0 cc

On ajoute à ce réactif le liquide de fermentation en expérience : 5 cc.

On agite et on ajoute pour homogénéiser un peu d'alcool. On porte au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, on laisse reposer pour la formation des phénylhydrazones. Finalement on filtre et on fait recristalliser dans le benzène pur, puis on procède à la détermination des constantes.

Préparation d'une oxine :

Il faut distinguer entre les dérivés aldéhydiques et cétoniques solubles dans l'eau et ceux insolubles dans l'eau.

Aldéhydes ou cétones solubles dans l'eau :

On fait agir à froid :

Liquide à examiner	5,0 cc
Hydroxylamine	1,0 g
Acétate de soude pulvérisé	2,0 g

On agite jusqu'à dissolution complète.

Pour les aldéhydes, on laisse reposer une heure à froid ; il se forme un précipité. Pour les cétoxines qui se forment en général plus difficilement, il faut chauffer au bain-marie pendant une à deux heures jusqu'à ce que le précipité se forme. On filtre, on essore et on recristallise dans l'eau distillée.

Aldéhydes ou cétones insolubles dans l'eau:

On introduit dans un petit ballon :

Liquide à examiner	5,0 cc
Pyridine	1,0 cc
Alcool	10,0 cc
Chlorhydrate d'hydroxylamine	1,0 g

On chauffe au réfrigérant à reflux pendant 30 minutes à 3 heures, puis on chasse l'alcool au bain-marie et on ajoute à chaud :

Eau distillée	10,0 cc

On mélange et on filtre à chaud au bain-marie. Recueillir le filtrat, laisser refroidir ; il se forme un précipité. Filtrer, essorer, sécher sur plaque poreuse et recristalliser dans l'alcool à 95° ou dans le benzène.

Nous avons ainsi obtenu un hydrazone correspondant au *phényl-hydrazone du rhamnose*, fusible à 124° et *une rhamnose-oxine* à point de fusion de 127° à 128°.

L'examen microscopique nous a montré l'aspect caractéristique du *rhamnosazone*, selon les données de G. Bertrand. Nous pouvons ainsi conclure que notre produit antifongique contient 2 molécules de glucose, 1 molécule de d-galactose et 1 molécule de rhamnose.

Identification de l'aglucone de notre antifongique :

Comme nous l'avons déjà dit, nous avons traité un gramme de notre substance antibiotique au réfrigérant à reflux par 30 cc d'acide chlorhydrique normal pour effectuer l'hydrolyse. Après neutralisation, le liquide a été filtré et évaporé à sec, puis nous procédons à une cristallisation fractionnée par l'alcool méthylique. Nous avons ainsi obtenu une très petite quantité de cristaux incolores, dont l'analyse élémentaire a donné les résultats suivants :

C : 66,36 — 66,14 — 66,10 .... Moyenne : 66,20 %
H : 7,25 — 7,07 — 7,16 .... Moyenne : 7,16 %
N : 4,05 — 3,87 — 3,93 .... Moyenne : 3,95 %

Par différence on obtient : O = 22,69 %.

En divisant par le poids atomique, on obtient :

$C^{5,51}$ $H^{7,16}$ $O^{1,42}$ $N^{0,28}$

puis, en divisant par 0,28 :

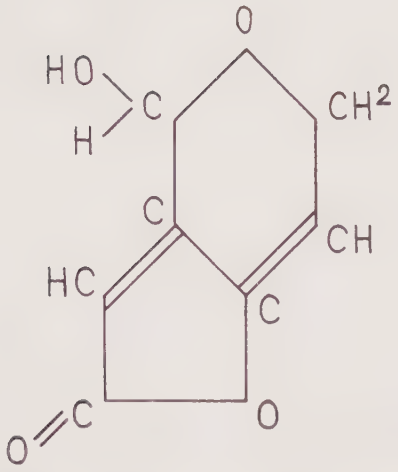
$C^{19,32}$ $H^{25,57}$ $O^{5,06}$ N^{1}, ce qui donne la formule moléculaire : $(C^{20}H^{26}O^{5}N)^{n}$.

La détermination du poids moléculaire a été faite par la méthode cryoscopique de Rast qui a donné comme résultat moyen un P.M. de 446. On peut donc admettre que n = 1 et que la formule brute de notre produit est bien : $C^{20}H^{26}O^{5}N$ (P.M. théorique 360).

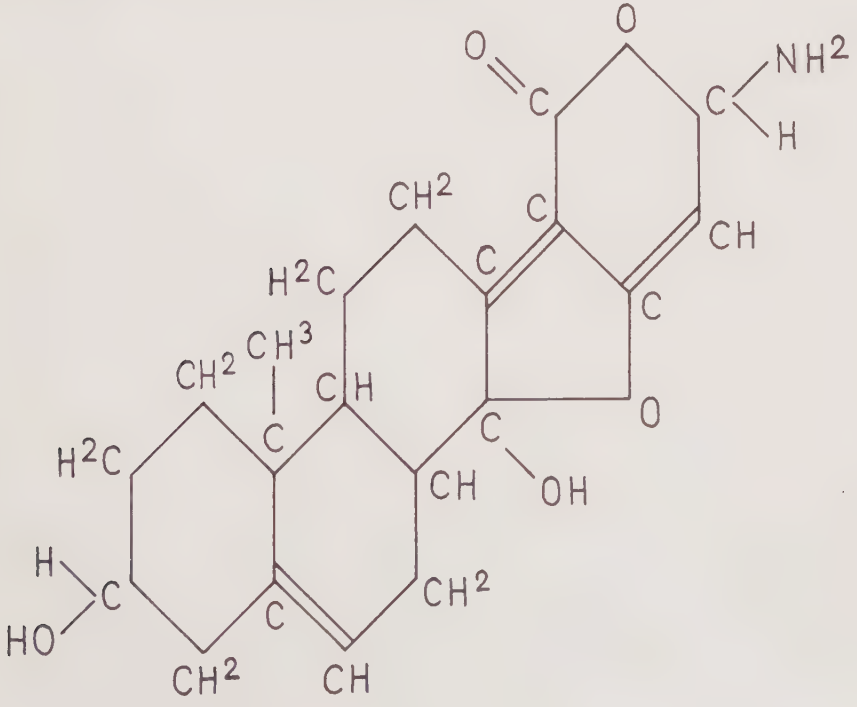
Il ne nous a pas été possible de déterminer exactement la formule développée de ce produit. Nous avons cependant essayé d'élucider ce problème en recherchant *les groupement caractéristiques de la molécule* et avons ainsi pu constater que *la réaction de Liebermann* au moyen d'anhydride acétique et d'une trace d'acide sulfurique concentré fait apparaître une coloration bleuâtre. *La réaction de Schiff* au moyen d'une trace d'acide chlorhydrique contenant un peu de chlorure ferrique fournit après évaporation un résidu violet. *La réaction d'un mélange de quatre gouttes de liqueur alcoolique de furfurol* à 1 % et de 2 cc de solution à 1 % de notre produit, placé sans mélanger sur 2 cc d'acide sulfurique concentré, donne un anneau coloré violet à la surface de séparation des deux liquides. L'addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique de notre produit à *une solution acétique de benzidine* donne une coloration jaune passant progressivement au brun.

Toutes ces réactions colorées se rapprochent de celles *du cholestérol et des stérols en général.* Nous pouvons donc affirmer que la partie principale de la molécule est formée du *groupe polycyclique cyclopentanophénanthrénique.*

L'activité antibiotique s'est avérée assez spécifique, quoique très différente des antibiotiques généralement employés en thérapeutique. *Sa forte action antifongique*, associée à un effet très limité sur *les bactéries*, rappelle les propriétés antibiotiques de *la Patuline* qui avaient même laissé espérer *une action antivirale.* Cette analogie avec la Patuline nous a fait rechercher une éventuelle ressemblance de structure. On sait que la formule de la Patuline a été déterminée par Woodward (76) comme étant :



D'autre part, l'azote présent dans notre antibiotique donne *les réactions caractéristiques des amines primaires.* Nous avons donc fait une tentative de formule développée sur la base des résultats précités. *En partant du noyau stérolique, du nombre élevé des atomes d'oxygène et de la propriété antibiotique spécifique* de cette molécule se rapprochant de la *Patuline*, en prenant d'autre part en considération la formule moléculaire : $C^{20}H^{26}O^5N$ nous proposons :



Cette formule stérolique n'est pas surprenante si l'on considère le grand nombre de produits d'origine naturelle à *formule stérolique et en particulier ceux élaborés par les microorganismes fongiques : les levures, les moisissures et même des cryptogames vasculaires (ergostérol, zymostérol, sitostérol, etc.).*

D'autre part, nous trouvons dans *la formule proposée un noyau furfuranique qui*, comme nous le savons, *a une spécificité d'action antibiotique contre les champignons inférieurs.* En effet, nous trouvons ce noyau dans *l'Amycétine, la Candicidine, la Pyromycine (Achromycine) la Fradicine et l'Endomycine* pour ne citer que ceux-ci. On sait d'autre part que *ce noyau spécifiquement antibiotique* se trouve également dans *l'Acide usnique, dans le Furalone et la Furadoïne*, qui sont des antimicrobiens synthétiques notoires.

Le produit cristallisé $C^{20}H^{26}O^{5}N$ est donc présent dans *l'antibiotique* ayant un poids moléculaire beaucoup plus élevé, *dû à une fixation de quatre molécules de glucide* que nous avons pu isoler et déterminer comme étant du glucose, du galactose et du rhamnose.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE DU PRODUIT BRUT

Pour effectuer ces recherches, nous nous sommes référé au travail de DROUHET (77) concernant *la Nystatine*. Nous avons employé *ce fongicide comme produit-test*. La poudre *de Nystatine* est dissoute dans une solution tampon phosphatée de pH = 7,0 contenant 70 % d'alcool éthylique. La concentration initiale est de 1 mg/cc, ce qui donne une très fine suspension homogène. Les dilutions suivantes ont été préparées dans la solution tampon à partir de la suspension-mère : 500 — 250 — 125 — 62,5 — 31,25 — 15,62 γ/cc.

En ce qui concerne *notre produit*, nous avons également préparé une solution-mère de 1 mg/cc et à partir de celles-ci les mêmes dilutions que précédemment.

Comme DROUHET le fait remarquer, *le milieu de Sabouraud se prête mal à ces dosages*, son acidité et la présence d'impuretés diminuent la sensibilité de l'antibiotique. On a donc utilisé le milieu suivant :

Asparagine	1,0 g
Glucose	20,0 g
Phosphate disodique	3,34 g
Phosphate monopotassique	0,54 g
Sulfate de magnésie	0,55 g
Solution de Berthelot d'oligo-éléments	X gouttes
Thiamine	10 γ
Acide nicotinique	10 γ
Pantothénate de calcium	10 γ
Pyridoxine	10 γ
Biotine	1 γ
Eau distillée	1 000 cc

Le pH est ajusté à 7,2.

Pour le *dosage du pouvoir antibiotique*, nous avons eu recours à la méthode de dilution par néphélométrie en introduisant dans des tubes standardisés de 105 mm × 17 mm notre substrat à la dose de 9 cc.

Après stérilisation à l'autoclave, nous avons ajouté dans chaque tube 1 cc de l'un ou l'autre *des antifongiques* à la concentration voulue. En

suivant toujours les données de DROUHET, on y introduit ensuite de la *Pénicilline* (110 U cc) et de *la Streptomycine* (200 γ cc) *afin d'éviter une contamination bactérienne*. Comme champignons-test nous avons employé *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida triadis*, var. *Blum et Ctenomyces mentagrophytes*. Chaque série d'essai était accompagnée de deux tubes témoins dépourvus d'antifongique. Nous donnons dans le tableau suivant les résultats de ces expériences après 48 et 96 heures de culture, en ajustant à 100° l'opacité du milieu de culture ensemencé.

TABLEAU N° 8

Organisme - test	Temps en heures	Degrés Lumetron trouvés pour Antifongique en γ/cc						
		0,78	1,56	3,12	6,25	12,50	25	Témoin
				Nystatine				
S. cerevisiae.....	48	28	82	85	100	100	100	25
	96	26	78	85	100	100	100	20
C. albicans	48	30	30	42	96	100	100	32
	96	27	28	37	92	100	100	25
C. triadis Blum ...	48	41	53	61	93	100	100	43
	96	39	48	59	92	100	100	38
Ct. mentagrophytes	48	55	58	56	57	55	58	57
	96	49	56	51	52	50	55	49
				Antifongique en étude				
S. cerevisiae.....	48	29	86	91	100	100	100	26
	96	28	82	87	100	100	100	20
C. albicans	48	30	88	90	100	100	100	33
	96	27	85	90	100	100	100	28
C. triadis Blum ...	48	83	100	100	100	100	100	46
	96	83	96	100	100	100	100	40
Ct. mentagrophytes	48	63	76	83	91	100	100	55
	96	58	71	80	87	100	100	50

Interprétation :

En considérant ces résultats, on note que *la Nystatine* commence à inhiber la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à la dose de 1.56 γ cc et l'inhibition est définitive à 6.25 γ cc. On constate d'autre part que les trois autres organismes sont beaucoup moins sensibles à *la Nystatine* : pour *le Candida albicans* la croissance est encore satisfaisante à la dose de 3.12 γ cc et l'inhibition n'est définitive qu'avec 12,5 γ cc. Il en est sensiblement de même pour *le Candida triadis*, dont la croissance normale est en général moins rapide que celle de *Candida albicans*. *Ctenomyces mentagrophytes* est absolument insensible à la *Nystatine*.

En ce qui concerne *l'antifongique en expérience*, nous notons que son action antibiotique contre *Saccharomyces cerevisiae* est absolument comparable à celle de *la Nystatine*. Il en va autrement pour *les deux Candida*, qui sont inhibés par des doses beaucoup plus faibles : ainsi *Candida albicans* ne se développe plus en présence de 3,12 γ cc et *Candida triadis* est encore beaucoup plus sensible puisqu'une dose de 1,56 γ cc arrête son développement. *Notre antifongique* présente également un pouvoir antibiotique contre *Ctenomyces mentagrophytes*, mais des doses de 3.12 et 6.25 γ cc permettent encore sa croissance. Il faut naturellement prendre en considération la vitesse de croissance de ces différents organismes en milieu ordinaire et ne comparer ces résultats que par rapport au tube témoin correspondant.

Chaque organisme a *sa phase de croissance propre*, dont il faut tenir compte : d'autre part, nous insistons sur *l'importance de l'inoculat* servant à l'ensemencement qui doit être sensiblement identique pour chaque série.

C'est pour cette raison que nous avons toujours préparé *une émulsion de spores de chaque organisme* en partant de cultures *sur milieu de Sabouraud gélosé* âgées de 4 jours. Après trituration soigneuse nous avons passé cette émulsion sur un filtre Chardin stérile placé aseptiquement dans un entonnoir de Büchner et la suspension fongique obtenue est ensuite ajustée au photocolorimètre à un degré fixe. On évite ainsi des facteurs d'erreurs grossières.

Pour pouvoir exprimer *le pouvoir antibiotique de notre produit antifongique* d'une façon indépendante des photocolorimètres employés, qui sont très différents d'un laboratoire à l'autre, nous proposons de se référer à la définition de *l'unité de Nystatine* : « la plus petite quantité d'antibiotique inhibant complètement la croissance *d'une souche-test* de *Saccharomyces cerevisiae* dans 1 cc de bouillon. Cette souche est en général deux fois plus sensible que *Candida albicans* ». Connaissant *l'unité de Nystatine*, on peut facilement calculer le rapport entre celle-ci et un autre antifongique en expérience.

Contrôle du pouvoir fongicide de notre antibiotique :

La méthode de dilution que nous venons d'employer permettant seulement de déterminer *l'action fongistatique*, nous avons cru nécessaire d'examiner *la vitalité des cultures* exposées aux différentes doses d'antibiotique. Nous avons contrôlé *l'action fongicide de la Nystatine et de notre produit* en prélevant 0.5 cc dans les tubes où nous avions constaté l'arrêt de croissance, qui sont ensuite ensemencés sur milieu de Sabouraud glucosé gélosé en boîtes de Pétri pour obtenir d'éventuelles rétrocultures.

Nous avons ainsi constaté que *Saccharomyces cerevisiae* est détruit après 96 heures de séjour dans un milieu contenant 6,25 γ cc de *Nystatine ou de l'antifongique en expérience*. La *Nystatine* inhibe définitivement *Candida albicans* et *Candida triadis* à la dose de 25 γ cc après 48 heures

de contact ; *notre antifongique* inhibe le *Candida albicans* à la dose de 12,5 γ/cc après 48 heures de contact et *Candida triadis* à la dose de 3,12 γ/cc dans le même temps. *Ctenomyces mentagrophytes* n'est inhibé qu'après 4 jours de contact par 15,5 γ/cc.

A titre comparatif nous donnons un tableau de DROUHET relatant l'activité fongistatique de la Nystatine sur les champignons inférieurs et les valeurs calculées proportionnelles en U/cc correspondant à celle de notre antifongique.

TABLEAU N° 9

Organisme	Concentration inhibitrice après 48 heures	
	Nystatine U/cc	Antifongique en étude U/cc
Candida albicans	7,81	4,0
Candida stelladoïdea	7,81	4,0
Candida guilliermondi	7,81	4,0
Candida krusei	7,81	4,0
Candida parapsilosis	7,81	4,0
Cryptococcus neoformans	3,90	4,0
Histoplasma capsulatum	3,90	?
Paracoccidioïdes brasiliensis	3,90	?
Blastomyces dermatitidis	1,95	?
Sporotrichum schenckii	31,20	12,0
Microsporum gypseum	62,50	16,0
Phialophora verrucosa	31,25	?
Trichophyton mentagrophytes	31,25	30,0
Trichophyton tonsurans	15,62	12,0
Ceratostomella ulmi	7,81	?
Geotrichum candidum	15,62	6,25
Trichophyton rosaceum	7,81	6,25
Microsporum canis	15,62	6,25
Microsporum audouini	15,62	6,25
Epidermophyton floccosum	7,81	6,25
Trichophyton rubrum	31,25	30,0
Cephalosporium sp.	31,25	?
Fusarium sp.	31,25	?
Phoma sp.	7,81	?
Penicillium claviforme	7,81	6,25
Penicillium sp.	7,81	?
Penicillium notatum	15,62	6,25
Aspergillus fumigatus	7,81	4,0
Alternaria sp.	3,90	?
Aspergillus sp.	31,25	?
Hormodendrum sop.	7,81	?
Endomycopsis fibuligor	3,90	?
Rhorotorula mucilaginosa	7,81	?
Saccharomyces cerevisiae	7,81	6,25

Les valeurs de ce tableau permettent de s'orienter dans l'établissement du pouvoir fongistatique de notre antibiotique, du moins en ce qui concerne les champignons pathogènes que nous avons testés.

Essais biologiques :

Nous avons déterminé *les doses léthales de notre antibiotique sur la souris* et avons trouvé les valeurs suivantes :

DL/50 par injection intraveineuse : 20 mg/kg.
DL/50 par injection intrapéritonéale : 22 mg/kg.
DL/50 par injection sous-cutanée : 285 mg/kg.

Aucune lésion n'a pu être observée à l'autopsie des animaux.

Pour déterminer la *toxicité chronique*, nous avons traité des *souris* pendant 4 semaines en injectant par voie sous-cutanée 50 mg kg tous les deux jours. Au bout de ce temps, les animaux étaient sacrifiés et l'autopsie n'a révélé aucune lésion visible. Ces injections étaient effectuées au moyen d'une suspension de notre antifongique dans une solution stérile de gélose à 0,25 %. Nous avons injecté chaque fois 0,5 cc à des souris pesant entre 18 et 25 g; l'expérience a été réalisée sur deux séries de 25 souris. *D'après la définition des auteurs américains*, un antibiotique est acceptable si, dans ces conditions, la mortalité est inférieure à 20 %.

Pour la recherche des *substances allergisantes et pyrogènes*, nous avons employé des lapins qui ont reçu par voie intraveineuse 2 mg kg de notre produit. Nous n'avons pu constater ni élévation de température, ni symptôme de choc.

En ce qui concerne la *stabilité du produit*, nous avions des échantillons âgés de 6 mois, conservés à la température du laboratoire, dont l'efficacité est restée stable.

L'étude continue pour contrôler *l'action thérapeutique de notre antifongique* à l'état brut et purifié, ainsi que pour chercher à isoler la fraction active éliminée lors de la purification finale.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons eu l'occasion d'étudier un *Streptomyces sécrétant un antibiotique à pouvoir essentiellement antifongique.* L'organisme que nous avons expérimenté était isolé de prélèvements pathologiques provenant d'une *moniliase testiculaire et prostatique.*

En nous basant sur la méthode de détermination des *Actinomyces* de WAKSMAN, de KRASSILNIKOFF et surtout de GAUSE, nous avons rangé notre organisme dans la série des *Streptomyces albus.* L'ensemble de ces organismes a été très bien étudié en 1934 par DUCHÉ; en nous référant à ces deux derniers auteurs, nous avons effectué une étude comparative de notre germe avec *Actinomyces albus, A. albidoflavus et A. lieskeï,* et avons constaté qu'il se rapproche le plus de ce dernier. Cette étude a été menée à bien grâce aux méthodes indiquées par GAUSE, employant tout d'abord un *milieu synthétique à base d'azote minéral,* puis un autre à base *d'azote organique.* Nous avons ensuite étudié les *caractères morphologiques,* en ce qui concerne les filaments aériens, le mycélium végétatif, les arthrospores, la constitution des hyphes droits, spiralés ou verticillés.

Nos investigations se sont ensuite adressées aux caractères biochimiques pour étudier le métabolisme glucidique, protidique, l'assimilation de l'azote minéral, le pouvoir réducteur et les propriétés enzymatiques vis-à-vis de l'amidon, de la cellulose, du lait, de la gélatine, et la sécrétion d'autres protéases.

L'ensemble de ces recherches nous a permis de fixer la position taxonomique de notre Actinomyces.

Le but essentiel de notre travail était l'étude du *pouvoir antifongique de l'organisme en question.* Nous avons tenu à rapporter la *classification* de WAKSMAN concernant les *antibiotiques antifongiques.* Nos recherches ont eu d'abord trait au pouvoir antibiotique du substrat de culture après en avoir séparé le résidu mycélien qui a été examiné de son côté. Ayant ainsi constaté que *l'antibiotique est endo- et exocellulaire,* nous avons procédé à la purification des extraits bruts.

Nous avons obtenu un précipité jaune en élevant le pH des filtrats. Ce précipité a été repris par l'eau acétique et précipité à nouveau par l'ammoniaque. Cet antibiotique brut s'est avéré toujours actif contre les *Candida* et *Ctenomyces mentagrophytes.* La purification a été poussée plus loin par une série de recristallisations dans le *dioxane,* puis dans le *méthanol.* Nous avons ainsi obtenu un produit cristallisé en fines aiguilles qui ont été examinées pour déterminer les propriétés chimiques et physiques.

Avant l'hydrolyse, ce produit a donné des réactions positives avec les *réactifs des alcaloïdes*. L'analyse élémentaire a donné la composition suivante: $C^{44}H^{74}O^{28}N$.

Nous avons ensuite procédé à une hydrolyse partielle au moyen d'acide chlorhydrique normal et avons pu scinder cette molécule en deux fractions, l'une à propriétés glucidiques, l'autre que l'on peut considérer comme un aglucone. Dans la fraction glucidique nous avons pu caractériser du glucose, du galactose et du rhamnose, et d'après nos analyses quantitatives, le produit global doit renfermer *deux molécules de glucose, une molécule de galactose et une molécule de rhamnose.*

La *fraction azotée* a donné en solution de méthanol des cristaux incolores contenant à l'analyse élémentaire : C = 66,20 %, H = 7,16 %, N = 3,95 %, O 22,69 %, ce qui correspond à la formule moléculaire : $C^{20}H^{26}O^{5}N$. La confirmation de cette formule a été basée sur le poids moléculaire déterminé par la méthode cryoscopique de Rast.

De nombreux essais nous ont démontré que ce corps *répondait positivement aux réactions colorées spécifiques du noyau cyclopentanophénanthrénique*. Partant d'un raisonnement purement spéculatif, nous avons tenté d'établir plus en détail la constitution de ces cristaux. L'*azote* présent dans cette molécule donne les réactions des amines primaires; *le nombre élevé des atomes d'oxygène, puis la propriété antibiotique spécifique rapprochent notre corps de la Patuline*, connue pour son action antifongique spécifique. Sachant d'autre part que le *noyau furfuranique présent dans la Patuline et dans un grand nombre d'autres antifongiques est caractéristique de cette spécificité*, nous avons essayé de constituer une formule développée possédant un *noyau stérolique, un noyau furfuranique et un azote à propriété d'amide primaire.*

Le produit cristallisé $C^{20}H^{26}O^{5}N$ est donc présent dans l'antibiotique isolé qui a un poids moléculaire beaucoup plus élevé, dû à la fixation de quatre molécules de glucides (2 glucose, 1 galactose et 1 rhamnose).

Le *pouvoir antibiotique du produit pur* a été étudié parallèlement à celui de la *Nystatine*. A ce sujet, nous avons eu recours à la méthode de dilution, en milieu synthétique nettement défini et en mesurant la sensibilité de quatre germes-test par néphélométrie. Ces organismes-test étaient *Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Candida triadis et Ctenomyces mentagrophytes*. Nous avons noté que l'action antibiotique de notre antifongique contre *Saccharomyces cerevisiae* est absolument comparable à celle de la *Nystatine*. Il en est autrement pour *les deux Candida*, inhibés à des doses beaucoup plus faibles; ainsi *Candida albicans* ne se développe plus en présence de 3,12 γ/cc et *Candida triadis* en présence de 1,56 γ/cc de notre produit; celui-ci présente également un pouvoir antifongique contre Ctenomyces mentagrophytes, mais qui est situé au delà de 6,25 γ/cc.

Nous avons ensuite contrôlé le *pouvoir fongicide* de notre produit toujours par rapport à celui de la *Nystatine*. *Saccharomyces cerevisiae*

est détruit après 96 heures dans un milieu contenant 6,25 γ/cc des deux antifongiques. La *Nystatine* inhibe *Candida albicans et Candida triadis* à la dose de 25 γ/cc après 48 heures de contact, notre antifongique inhibe le premier à la dose de 12,5 γ/cc et le second avec 3,12 γ/cc dans le même temps. La *Nystatine* n'a pas détruit la vitalité de *Ctenomyces mentagrophytes* dans nos conditions expérimentales, alors que notre antifongique tue cet organisme après 4 jours de contact et à la dose de 12,5 γ cc. Nous avons étudié le pouvoir fongistatique des deux antibiotiques vis-à-vis d'un certain nombre de champignons inférieurs pathogènes, en rapport avec les résultats de Drouhet exprimés en U/cc de Nystatine.

Nos essais biologiques ont eu trait à *la dose léthale de notre antibiotique sur la souris*, et nous avons trouvé les valeurs suivantes :

DL/50 par injection intraveineuse = 20 mg/kg,
DL/50 par injection intrapéritonéale = 22 mg/kg,
DL/50 par injection sous-cutanée = 285 mg/kg.

Ces doses n'ont pas amené de modifications anatomiques constatables à l'autopsie. Il n'y a *aucune toxicité chronique chez la souris*, après un traitement pendant 4 semaines par des injections sous-cutanées de 50 mg kg tous les deux jours. L'injection intraveineuse de 2 mg/kg n'occasionne chez le lapin ni réaction allergisante, ni réaction pyrogène. La stabilité du produit a été contrôlée pendant 6 mois : son efficacité est restée inchangée pendant ce temps de conservation à la température du laboratoire.

Nous avons ainsi eu l'occasion d'isoler et d'étudier un *Streptomyces du genre albus* de Duché et se rapprochant de *Streptomyces lieskeï* de Gause, provenant d'un cas pathologique de Moniliase uréthro-orchito-prostatique due à *Candida triadis*, var. Blum.

Notre Streptomyces a un pouvoir antifongique remarquable, dû à un *antibiotique* dont nous avons étudié, après purification, les propriétés physico-chimiques, biologiques et toxiniques. Son activité antifongique et son spectre fongistatique ont été déterminés par rapport à ceux de la *Nystatine*.

BIBLIOGRAPHIE

(38) Barbier P. — Semaine des Hôpitaux, janvier 1956, 32e année, N° 1.

(40 b) Beauvais M. — Traitement interne des Moniliases par les Esters de l'acide para-oxybenzoïque. Thèse Docteur Pharm. Strasbourg, 1957.

(47) Bograd. — Acta Derm. et Syph., 1943, 48, 511.

(8) Christie. — Pediatries, 1951, 7, 7-18.

(27) Conan et Hyman. — Amer. Journ. Med., 1950, 9, 408.

(12) Curtis. — Therapy of Fungus Diseases, Sternberg, 1955, 136.

(7) Curtis et Cowley. — Journ. Urol., 1947, 57, 781-7.

(3) Dejan et Nauaranne. — Méd. Trop. Franç. 1953, 4, 449.

(36) Dogeotti. — Journées Thérapeutiques de Paris, 1955.

(51) Dolce et Nickerson. — Arch. Derm. et Syph., 1947, 55, 379.

(35) Drouhet. — Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 298.

(77) Drouhet. — Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 302.

(67) Duché. — Les Actinomyces du groupe albus. Encyclopédie mycol. 1934, VI, Lechevalier, Paris.

(5) Eckert. — Klin. Wochenschr., 1922, N° 36.

(10) Elson. — Journ. Infect. Diseases, 1945, 76, 193-197.

(31) Foley et Winter. — Journ. Invest. Dis., 1949, 85, 268-274.

(53) Franck et Sternberg. — Arch. Derm. et Syph., 1950, 62, 287.

(71) Gause G.-F. — Zur Klassifizierung der Actinomyceten. G. Fischer Verlag, Iena, 1958.

(58) MacGavak. — Arch. Derm. et Syph., 1949, 59, 94.

(46) Goetz. — Der Hautarzt, 1950, 1, 368.

(56) Golden et Oster. — Journ. Amer. Pharm. Ass., 1947, 36, 359.

(64) Grèze J. — Les médicaments antifongiques modernes dans le traitement des mycoses profondes. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1956.

(73) Grigoraki. — Lyon Médical 1928. C.R. Soc. Biol., 1939, 130, 889; 1940, 131, 767. Sénescence et évolution, Maloine, Paris, 1945.

(69) Hauduroy P. — Dictionnaire des Bactéries pathogènes, Masson, Paris, 1953.

(39) Hazen et Brown. — Proc. Soc. Exp. Biol. Méd., 1951, 76, 93.

(42) Hopkins. — Journ. Invest. Dermat., 1946, 7, 239.

(24) Johnson et Burdon. — Journ. Bact., 1946, 51, 591.

(6) Keeney. — Bull. John Hopkin's Hosp., 1944, 75, 393-409.

(44) Kligman et Anderson. — Journ. Invest. Dermat., 1951, 16, 155.

(43) Klingman et Rosenzweig. — Journ. Invest. Dermat., 1948, 10, 51.

(70) Krassilnikov. — Mikrobiol., 1949, XVIII, 397.

(32) Kunstadter et Mac Lean. — Journ. Amer. Med. Ass., 1952, 149, N° 9, 829.

(20) Lack. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 72, 656.

(22) Landy. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 67, 539.

(66) Lasseur. — Contribution à l'étude des pigments bactériens, Bul. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy, 1927.

(34) Lelong et Alison. — Annales Médicales, 1953, I, 27.

(60) Lewis, Hopper et Reiss. — Journ. Amer. Med. Ass., 1946, 132, 62.

(26) Loewenthal et Tolmach. — Journal Invest. Dermat., 1947, 9, 357.

(18) Ma et Fontaine. — Arch. Biochem., 1948, 16, 399-402.

(55 a) Malhuret Simone. — Action fungicide de quelques acides gras. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1951.

(29) Menart-Pourtant. — Les mycoses au cours de l'antibiothérapie. Thèse Doct. Méd. Paris 1954.

(50) Miller, Lowenfish et Beattie. — Journ. Amer. Med. Ass., 1946, 132, 67.

(55) Mitchell. — Med. Clin. N. Amer., 1948, 32, 283.

(45) Mitchell, Arnold et Chim. — Journ. Amer. Pharm. Ass., 1952, 61, 472.

(23) Moore et Wooldridge. — Journ. Invest. Dermat., 1950, 14, 265.

(74) Neukirch. — Ueber Strahlenpilze. Thèse Sciences Strasbourg, 1902.

(40) Newcomer. — Antibiotics Annual, 1956, 6, 831.

(13) Nichols et Hendle. — Journ. Labor. and Clin. Med., 1948, mai, XXXIII, 521.

(54) Oster et Golden. — Journ. Amer. Pharm. Ass., 1948, 37, 283.

(63) Oster et Golden. — Journ. Amer. Pharm. Ass., 1948, 37, 283.

(30) Pesce et Menart. — Traitement des mycoses par l'acide undécylénique. Bull. Méd. Novembre 1953.

(75) Petit A. — Contribution à l'étude cytologique et taxinomique des Bactéries. Thèse Sciences Paris, 1927.

(4) Poncet et Berard. — Gazette des Hôpitaux, 1911, LXXXIV, 13, 181.

(16) Reilly, Schatz et Waksman. — Journ. Bact., 1945, 49, 585.

(14) Reiss. — Ann. N.Y. Acad. Sc., 1952, 55, 1147.

(52) Reiss et Doherty. — N.Y. State Journ. Med., 1950, 49, 1939-43.

(61) Reiss et Lustig. — Dermatologia, 1948, 97, 312.

(48) Richter. — Arch. Derm. et Syph., 1950, 190, 563.

(80) Rickli R. – Les dysidroses plantaires et thérapeutiques antimycosiques. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1953.

(62) Riley et Flower. — Journ. Invest. Dermat., 1950, 15, 355.

(37) Rimbaud et Rioux. — Presse Médicale, 1955, 53, 701.

(40 a) Sabalitschka et Neufeld-Crzellitzer. — Arzneimittelforsch. 1954, 9, 575.

(15) Sanders. — Lancet, 1946, 201, 44.

(19) Sartory A. et Meyer J. — C.R. Acad. Sc., 1946, 222, février et Libre Pharmacie 1947, N° 28, p. 5.

(2) Sartory A., Sartory R. et Meyer J. — Congrès A.F.A.S., Rabat 1934, et Bull. Soc. Pharmacol., 1934, 41, 338.

(79) Schaffhauser Matteo. — La désinfection par contact direct. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1956.

(11) Schoenbach. — Trans. N.Y. Acad. Sc., 1952, Sér. II, 14, 272.

(28) Smith D.T. — Fungous infections in the United-States. J.A.M.A. 1949, 141, 1222-26.

(17) Strauss, Kligman et Pillsburg. — Amer. Rev. Tuberc., 1949, 63, 441.

(78) Suenderhauf : Études de produits fungicides. Thèse Doct. Phar. Strasbourg, 1950.

(49) Sullivan et Berestion. — Journ. Invest. Dermat., 1952, 19, 175.

(25) Swart, Romano et Waksman. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 73, 376.

(41) Tager et Danowski. — Journ. Infections Diseases, 1948, 82, 126.

(33) Taylor et Rundle. — The Lancet, 21 juin 1952.

(9) Tisdale et Flemer. — Boyce Thompson Inst., 1951, 16, 303.

(19 a) Ungar S. — Antifongiques isolés de différentes Solanacées, Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1955.

(1) Underwood. — Journ. Amer. Med. Ass., 1946, 130, 728.

(63 b) Wahba J.-A. — Essais sur le pouvoir antifongique de quelques dérivés d'alcaloïdes, Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1956.

(65) Waksman. — Antagonisme microbien. Williams et Wilking, Baltimore, 1932.

(68) Waksman et Lechevalier. — Actinomyces and their Antibiotics. Williams et Wilking, Baltimore, 1952.

(57) Walker, Porter et Dekay. — Journ. Amer. Pharm. Ass., 1952, 41, 77.

(72) Walter L. — Étude d'un Candida responsable d'une orchi-épididymite granulomateuse pseudo-tumorale (Candida triadis Langeron et Guerra, var. Blum). Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(63 a) Widder A. — L'action destructrice de différents antiseptiques sur les champignons cellulophages. Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1933.

(21) Wier. — Amer. Journ. Med. Soc., 1952, 224, 70.

(59) Woodward, Kingsey et Williams. — Journ. Lab. Clin. Med., 1933, 19, 1216 ; 1934, 20, 950.

(76) Woodward et Singhe. — Journ. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 758. Experientia, 1950, 6, 328.

Vu, Strasbourg, le 21 septembre 1961

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 22 septembre 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

P. DUQUÉNOIS

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 2 octobre 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Généralités sur les antifongiques 9

Revue des principaux antifongiques actuellement utilisés 9

Antifongiques utilisés dans le traitement des mycoses profondes 10

Antifongiques utilisés dans le traitement des mycoses superficielles ... 14

CHAPITRE II

Mode d'action des antibiotiques antifongiques 19

Effets antagonistes des bactéries et des actinomycètes sur les champignons 21

CHAPITRE III

Classification des Actinomyces 25

Classification des Streptomyces 27

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

Caractérisation de l'Actinomyces en étude 35

Méthodes de culture et d'isolement 35
Description du germe en étude 39
Auxanogramme de l'azote 42
Propriétés biochimiques 43
Pouvoir réducteur 43
Dégradation des matières amylacées 44

CHAPITRE V

Étude du pouvoir antibiotique de notre Streptomyces 49

Recherche du pouvoir antibiotique du substrat de culture 49
Recherche du pouvoir antibiotique dans le résidu du mycélium 50
Essai de purification de l'extrait brut 50
Essai d'hydrolyse 52
Identification du glucose 52
Identification du galactose 53
Identification du rhamnose 54
Préparation d'un phénylhydrazone 54
Préparation d'une oxine 54
Aldéhydes ou cétones solubles ou insolubles dans l'eau 55
Identification de l'aglucone de notre antifongique 55

CHAPITRE VI

Étude du pouvoir antibiotique du produit brut 59

Contrôle du pouvoir fongicide de notre antibiotique 61

Essais biologiques 63

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 65

BIBLIOGRAPHIE 69

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

*

Dépôt légal N° 1112/1961